

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública

Laís Ariane de Siqueira Lira

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA
O DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR**

Recife
2012

LAÍS ARIANE DE SIQUEIRA LIRA

ANÁLISE DO DESEMPENHO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA O
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Haiana Charifker Schindler
Co-orientadora: Msc. Lílian Maria Lapa Montenegro

RECIFE

2012

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- L768a Lira, Laís Ariane de Siqueira.
Análise do desempenho da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da tuberculose pulmonar / Laís Ariane de Siqueira Lira. - Recife: s. n, 2012.
73 p. : ilustr.
- Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientadora: Haiana Charifker Schindler; co-orientadora: Lílian Maria Lapa Montenegro.
1. Tuberculose. diag. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 3. Mycobacterium tuberculosis. 1. Schindler, Haiana Charifker. II. Montenegro, Lílian Maria Lapa. III. Título.

CDU 616-002.5

LAÍS ARIANE DE SIQUEIRA LIRA

ANÁLISE DO DESEMPENHO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL PARA O
DIAGNÓSTICO DA TUBERCULOSE PULMONAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 02 /04 /2012

BANCA EXAMINADORA

PhD Haiana Charifker Schindler (Orientadora)
CPqAM/FIOCRUZ

PhD Milena de Paiva Cavalcanti (Membro interno)
CPqAM/FIOCRUZ

PhD Virgínia Maria Barros de Lorena (Membro externo)
CPqAM/FIOCRUZ

Aos meus pais, Edda e Rodolfo, pelos ensinamentos,
dedicação, inspiração e amor incondicional.

À minha irmã Liana, pelo carinho, amor e amizade.

Com alegria, carinho e amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida dando-me serenidade, sabedoria, paz, conforto e coragem para alcançar meus objetivos e superar obstáculos.

A meus pais, Edda e Rodolfo, pelo carinho, amor, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Por serem meu eterno conforto e minha inspiração para me tornar quem sou hoje como pessoa e como profissional.

À minha irmã Liana, pela paciência, amor, amizade, momentos de descontração e inspiração por ser meu complemento que tanto me orgulha.

À minha orientadora Haiana Schindler, pela maravilhosa oportunidade de ingressar na vida científica e desenvolver o que eu realmente amo. Por confiar em mim e acreditar no meu potencial e dedicação. Uma pessoa que me ajudou a amadurecer cientificamente e que me transmitiu grandes ensinamentos.

À minha co-orientadora Lílian Montenegro, pelos ensinamentos, paciência, carinho, apoio, incentivo, por me dar oportunidade e acreditar na minha capacidade e potencial. Pelo exemplo grandioso de pessoa e profissional.

A toda a equipe do laboratório de Imunoepidemiologia: Fabiana, Heidi, Andréa, Juliana, Gabriela, Rosana, Márcia, Klarissa, Marcela, André, Lílian e Haiana. Pela união, apoio, ensinamentos, dedicação, esforço para o crescimento de todos e, acima de tudo, amizade. Pelas constantes sessões de terapias e pela constante alegria que faz com que o trabalho diário seja motivo de prazer e felicidade.

Aos amigos e agregados das “tuberculetes” que de alguma forma, me incentivaram, contribuíram para meu crescimento e construção deste trabalho: Romero, Juliana Falcão, Neide, Kaly, Bruna, Simone.

A minha amiga Fabiana, companheira de experimentos com quem dividi muitas comemorações com o sucesso de cada experimento e com quem “quebrava a cabeça” para

tentar conseguir soluções para as dificuldades. Acima de tudo, pela amizade incondicional, por sua bondade, alto-astral, bom-humor serem fundamentais no meu dia-a-dia.

Às minhas amigas Jéssica, Mari Arruda, Amália, que fizeram parte dos momentos maravilhosos da minha formação e com quem dividi muitos estresses, festas, conquistas, alegrias. A minha eterna e infinita amizade.

À minha amiga Jéssica, que conviveu comigo durante os quatro anos da universidade, e com quem eu sempre tive apoio, amizade, companheirismo, diversão. Pela paciência, enfrentar comigo obstáculos e comemorar as vitórias. Pela amizade linda, verdadeira e eterna.

Aos amigos da turma do mestrado, que tive momentos maravilhosos de alegria e descontração em uma trajetória que foi muito mais prazerosa com a companhia de todos eles.

Ao meu namorado Victor, pelo amor, carinho, apoio, paciência, incentivo, conforto. Por me acalmar durante as dificuldades e me proporcionar maravilhosos momentos de alegria e descontração. Por ser um exemplo de determinação e me mostrar que o meu esforço é sempre recompensado.

Aos membros e colaboradores do departamento de Imunologia, que de forma direta ou indireta contribuíram com este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Milena Cavalcanti e Virgínia Lorena, por estarem sempre aptas e dispostas a ajudar e contribuir para o crescimento do meu trabalho, sendo motivo de felicidade de estarem presentes na conclusão deste trabalho.

A todos que me apoiaram, incentivaram e ajudaram na minha formação como pessoa e profissional, e que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Muito obrigada!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

LIRA, Laís Ariane de Siqueira. Avaliação do desempenho da técnica de PCR em tempo real para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

A tuberculose constitui um grave problema de saúde pública, com preocupação e repercussão mundial. No Brasil, foram notificados 78.564 mil casos no ano de 2011, com 83.55% dos casos da forma pulmonar, sendo Recife a capital brasileira com maior taxa de mortalidade específica por tuberculose. O controle da doença consiste em um diagnóstico precoce e eficaz associado a um tratamento adequado, contudo os métodos convencionais apresentam limitações, como a baixa sensibilidade e o resultado tardio. Por isto, métodos moleculares vêm sendo propostos para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas. Recentemente, a técnica da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR) tem sido desenvolvida, apresentando como diferencial a capacidade de amplificação e detecção do DNA ocorrerem simultaneamente, através de um sistema de fluorescência. O estudo avaliou o desempenho da técnica de qPCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* nos pacientes com tuberculose pulmonar. Para avaliar o limite de detecção, foi construída uma curva de diluição a partir de cepa de referência do *M. tuberculosis*, em que se determinou que o sistema foi capaz de detectar até 3×10^0 bacilos/ml. Este limite foi correspondente ao ciclo de amplificação 30, o qual foi utilizado como limite máximo de positividade das amostras analisadas. Foram avaliadas 165 amostras de escarro de pacientes suspeitos de tuberculose pulmonar, apresentando sensibilidade de 87.9% e especificidade de 98%, considerando a cultura e/ou resposta ao tratamento específico como padrão-ouro. A técnica de qPCR demonstrou um excelente desempenho, podendo ser utilizada como uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. O diagnóstico da TB deve estar fundamentado na análise conjunta de vários parâmetros como baciloscopia, cultura, manifestações clínicas e a prova terapêutica.

Palavras-chave: Tuberculose - diagnóstico, PCR em Tempo Real, *Mycobacterium tuberculosis*.

LIRA, Laís Ariane de Siqueira. Assessment of performance of the real time PCR for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. 2012. Dissertation (Master of Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

Tuberculosis is a serious health problem public concern and with worldwide repercussions. On Brazil, 78.564,000 cases were reported in the year 2011, with 83.55% of cases of pulmonary, and Recife the Brazilian capital with a higher mortality rate specific for tuberculosis. The disease control is in early and effective diagnosis associated with a appropriate treatment, however, conventional methods have limitations such as low sensitivity and late results. Therefore, molecular methods have been proposed for the diagnosis of various diseases infectious. Recently, the technique of real time polymerase chain reaction (qPCR) has been developed, presenting a differential ability to DNA amplification and detection occur simultaneously, through a fluorescence system. The study evaluated the performance of the qPCR for specific detection of complex *Mycobacterium tuberculosis* complex in patients with pulmonary tuberculosis. To evaluate the limit of detection, was done a dilution curve from reference strain of *M. tuberculosis*, has been determined that the system was able to detect up to 3×10^0 bacilli / ml. This threshold is corresponding to the amplification cycle 30, which was used as the maximum limit of positive samples. We evaluated 165 sputum samples from patients suspected of pulmonary tuberculosis, with sensitivity of 87.9% and specificity of 98% considering the culture and / or response to treatment as the gold standard. The qPCR showed an excellent performance and can be used as an auxiliary tool for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. The diagnosis of TB should be based on joint analysis of various parameters such as smear, culture, clinical and therapeutic trial.

Key words: Tuberculosis Diagnosis, Real- time PCR, *Mycobacterium tuberculosis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Taxa de incidência estimada de tuberculose no mundo, em 2010. 5
- Figura 2** - Representação da PCR em tempo real utilizando sonda Taqman em todas as etapas da reação. 16
- Figura 3** - Gráfico de amplificação de qPCR utilizando o sistema TaqMan com DNA de cepa de referência de *M. tuberculosis* (H37Rv), realizado a partir de curva de diluição com amostra de escarro “contaminada” com bacilos viáveis. 31
- Figura 4** - Gráfico de amplificação de qPCR utilizando o sistema *TaqMan* com amostras de escarros de pacientes diagnosticados com TB e sem TB. Amostras de escarro foram positivas do *Ct* 18 ao 30. 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e epidemiológicas dos 66 indivíduos diagnosticados como “TB doença”.	29
Tabela 2 - Características clínicas e epidemiológicas dos 99 indivíduos diagnosticados como “Não TB”.	30
Tabela 3 - Desempenho da técnica de qPCR nos 165 pacientes com suspeita de TB pulmonar utilizando a baciloscopia como padrão-ouro.	32
Tabela 4 - Desempenho da técnica de qPCR nos 165 pacientes com suspeita de TB pulmonar utilizando a cultura como padrão-ouro.	33
Tabela 5 - Desempenho da técnica de qPCR nos 165 pacientes com suspeita de TB pulmonar utilizando a cultura e/ou resposta ao tratamento específico como padrão-ouro.	34
Tabela 6 - Desempenho da técnica de qPCR nos 165 pacientes com suspeita de TB pulmonar em comparação com os métodos convencionais de diagnóstico utilizados como padrões – ouro isoladamente.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BAAR- Bacilos álcool-ácido resistentes
- BACTEC- Becton Dickinson Diagnostic Instruments Systems
- BCG – Bacilo Calmette-Guérin
- BK- Bacilo de Koch
- CPqAM- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
- Ct - Cycle threshold (ciclo limiar)
- DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
- DOTS – Directly Observed Treatment Strategy
- E- Especificidade
- FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz
- fg – Fentograma
- HIV – Human immunodeficiency vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- IC- Intervalo de confiança
- IS- *Insertion sequence* (elemento de inserção)
- LJ - Lowestein-Jensen
- MDR – Multidrogarresistente
- M. – *Mycobacterium*
- ml- mililitro
- nM- Nanomolar
- NaOH – Hidróxido de Sódio
- NTC – *Non template control* (Controle negativo)
- OMS- Organização Mundial de Saúde
- qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
- pb – Pares de Base
- PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
- pg – picograma
- PNB - p-nitrobenzoato
- ROX – 6-carbox-X-rodamina
- rpm – Rotação por minuto
- qPCR/PCR em tempo real - Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa
- S- Sensibilidade
- SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação

Slope – Coeficiente angular da reta

SUS- Sistema único de saúde

TB – Tuberculose

VPN- Valor preditivo negativo

VPP- Valor preditivo positivo

WHO- World Health Organization

XDR- Extremamente resistentes

ZN- Ziehl-Neelsen

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Histórico	15
1.2 Epidemiologia	15
1.2.1 Epidemiologia no mundo	15
1.2.2 Epidemiologia no Brasil	17
1.3 Agente etiológico: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
1.4 Transmissão	18
1.5 Imunopatogenia	19
1.6 Controle e Prevenção	20
1.7 Diagnóstico	22
1.7.1 Diagnóstico clínico e laboratorial	22
1.7.2 Diagnóstico molecular	25
1.7.3 PCR em tempo real	26
2 JUSTIFICATIVA	29
3 PERGUNTA CONDUTORA	30
4 HIPÓTESE	31
5 OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo Geral	32
5.2 Objetivos Específicos	32
6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	33
6.1 População e local de estudo	33
6.2 Desenho do estudo	33
6.3 Casuística	33
6.4 Critérios de definição de caso de TB Pulmonar: Padrão – ouro	34
6.5 Critérios de exclusão	34
6.6 Critérios de perda	34
6.7 Considerações éticas	34
6.8 Métodos de processamento das amostras biológicas	35
6.8.1 Coleta e descontaminação das amostras de escarro	35
6.8.2 Baciloscopia	35
6.8.3 Cultura e Identificação de micobactérias em meio Löwenstein-Jensen	35
6.8.4 Extração e purificação de DNA de amostras clínicas	36

6.8.5 Curva de diluição utilizando cepa de referência do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em amostra de escarro	37
6.8.6 Critérios de positividade da amostra de escarro na qPCR	37
6.9 Método molecular	37
6.9.1 Alvo molecular	37
6.9.2 Condições da PCR em tempo real	38
6.9.3 Avaliação das amostras pelo gene constitutivo da β -actina	38
6.10 Análise estatística	39
7 RESULTADOS	40
7.1 Análise do perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos indivíduos participantes do estudo	40
7.2 Avaliação do limite de detecção da qPCR através de curva de diluição de cepa de referência de <i>M. tuberculosis</i> (H37Rv) em amostra de escarro	42
7.3 Avaliação da técnica de qPCR em amostras de escarro coletadas de pacientes suspeitos de TB pulmonar	42
7.4 Avaliação do desempenho da qPCR em amostras de escarro utilizando a baciloscopia como padrão-ouro	43
7.5 Avaliação do desempenho da qPCR em amostras de escarro utilizando a cultura como padrão-ouro	44
7.6 Avaliação do desempenho da qPCR em amostras de escarro utilizando a cultura e/ou resposta ao tratamento específico como padrão-ouro	44
7.7 Avaliação do desempenho da qPCR em comparação com os métodos convencionais de diagnóstico utilizados como padrão – ouro isoladamente	45
8 DISCUSSÃO	46
9 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido	65
APÊNDICE B - Ficha clínica-epidemiológica	67
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CpqAM/FIOCRUZ	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de evolução crônica que tem como agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*. Acredita-se que este microorganismo (conhecido como bacilo de Koch) seja anterior ao próprio homem, acometendo formas ainda mais elementares de vida microscópica. O encontro entre o agente etiológico da TB e a espécie humana levou ao desenvolvimento de estratégias de adaptação ao novo hospedeiro: além da perda da capacidade de multiplicação no meio exterior, o bacilo inicialmente apresentou uma alta virulência para, posteriormente, restringir sua capacidade destrutiva, tornando-se um comensal aceitável para os agrupamentos humanos (BERTOLLI, 2001; COLE et al. 1998).

É provável que os primeiros homínídeos já padecessem com a doença, mesmo que a existência de pequenos grupos isolados inibisse a difusão maciça da moléstia. Há indícios que seus riscos se ampliaram com o adensamento das populações ao passo do sentido gregário que essas passaram a ter desde a revolução agrícola no Neolítico, quando os agrupamentos humanos cresceram em número e a domesticação de algumas espécies animais ampliou as possibilidades de contágio. Atualmente, a urbanização, com a decorrente aproximação e a convivência prolongada dos indivíduos, tem sido importante fator de multiplicação da TB (BERTOLLI, 2001; BRASIL, 2002).

Sabe-se que a doença esteve presente entre os egípcios, encontrando-se indícios (Mal de Pott) em partes de corpos mumificados e com data aproximada de 6.000 anos. Um dos maiores trabalhos sobre TB foi executado em 1882, pelo cientista Robert Koch, que isolou e cultivou o *Mycobacterium tuberculosis* identificando a bactéria como o agente etiológico da TB (BLOOM; MURRAY, 1992). Em 1890, ele anunciou a descoberta de uma substância denominada tuberculina, que poderia ser útil como uma ferramenta de diagnóstico para detectar a doença devido à reação intensificada desenvolvida por animais doentes vacinados com a tuberculina. Este conceito perpetuou-se por vários anos até a observação de que tanto animais saudáveis quanto animais doentes poderiam reagir à tuberculina. Como conclusão, se observou que animais infectados com o *M. tuberculosis* reagiam à tuberculina, enquanto que

os saudáveis e não infectados, não tinham reação. Portanto, o teste tuberculínico tornou-se, então, a principal ferramenta de diagnóstico para a TB infecção (DUCATI et al., 2006).

No mesmo período, Koch desenvolveu métodos de coloração para a identificação do bacilo, cujas técnicas foram subseqüentemente melhoradas pelo bacteriologista alemão Paul Ehrlich, que desenvolveu a coloração de Ziehl- Nielsen para detecção de bacilos, método que vem sendo usado até hoje para o diagnóstico da TB (DUCATI et al., 2006). A Descoberta de Koch permitiu aos investigadores centrar esforços no desenvolvimento de terapias novas e mais eficientes para tratar o paciente com TB (DUCATI et al., 2006).

No Brasil, acredita-se que a doença foi introduzida pelos missionários portugueses e jesuítas, desde 1500. A vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin) foi implementada em 1973, logo se tornando obrigatória para os menores de um ano. A mortalidade por TB, que secularmente vinha diminuindo, sofreu importante impacto positivo com a introdução da quimioterapia de curta duração, chegando a diminuir 50%, da década de 70 para a de 80. (HIJJAR et al., 2005; RUFFINO-NETTO, 2002).

Em todo o mundo, o mapa da prevalência da TB acompanha o mapa da miséria. Além da desnutrição deprimir a imunidade celular, as condições de moradia, promíscuas, em cômodos únicos, e sem ventilação, propiciam uma maior carga infectante, que também condiciona o maior adoecimento, seja primo-infecção ou re-infecção (PANDOLFI et al., 2007).

1.2 Epidemiologia

1.2.1 Epidemiologia no mundo

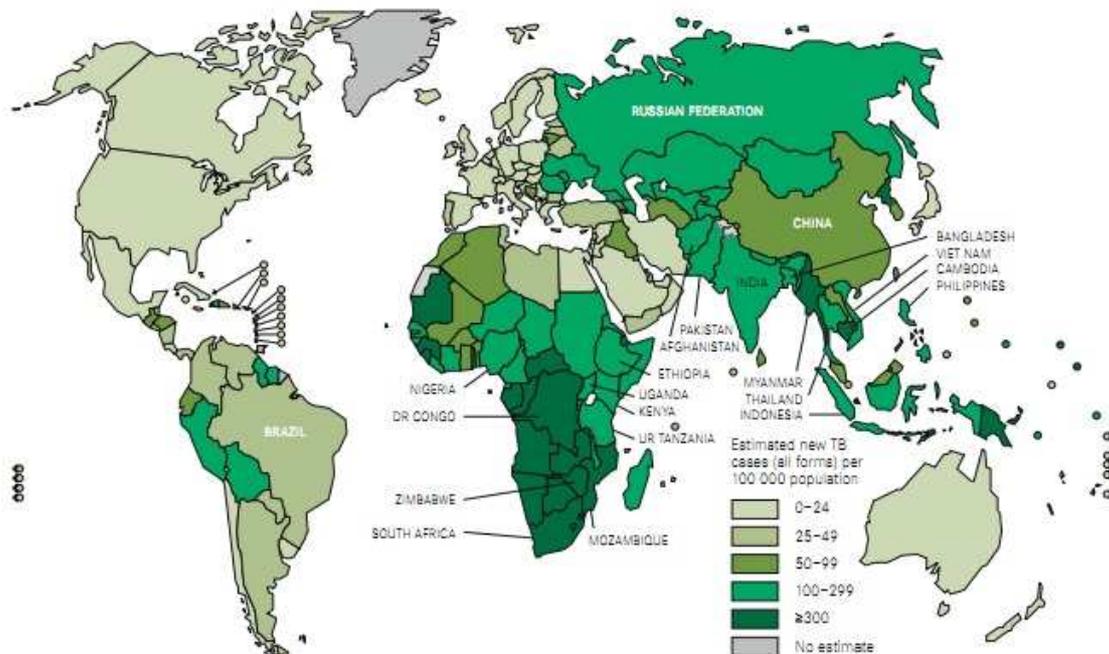
No século XX a TB chegou a alcançar uma taxa de incidência próxima de zero na maior parte do mundo, em suas primeiras oito décadas. Entretanto, a partir da década de 80, com o advento da infecção pelo vírus da Síndrome da Imunodeficiência Humana (HIV), as taxas de incidência, morbidade e mortalidade por TB voltaram a crescer rapidamente (LEROY; SALMI; DUPON, 1997; SILVIA, 2005). A doença que parecia estar em vias de erradicação, tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade. Este quadro deve-se principalmente às co-infecções com o HIV; as desigualdades sociais e suas implicações, sobretudo nos países em desenvolvimento (condições precárias de moradia,

alimentação, transporte e educação); o envelhecimento da população com o aumento da expectativa de vida; ineficiência dos programas de controle da doença e os movimentos migratórios constantes da população (KIM et al., 2008; LEROY; SALMI; DUPON, 1997; SILVIA, 2005).

A TB, embora tenha cura, atualmente permanece como uma das maiores causas de doença e morte na população mundial, sobretudo na Ásia e África, embora tenha cura. Trata-se da doença infecciosa com as maiores taxas de mortalidade em adultos, onde a maioria dos casos ocorre na população economicamente produtiva e é a principal causa de morte por infecção em mulheres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011). A situação é agravada pela emergência de cepas multidrogarresistentes (MDR) e as extremamente resistentes (XDR) aos medicamentos contra o *M. tuberculosis*. A resistência às drogas ocorre, principalmente, devido a prescrições inadequadas ou ao descumprimento da prescrição médica (irregularidade ou abandono do tratamento). A tuberculose MDR está associada com altas taxas de mortalidade em torno de 50 a 80% dos casos (SANKAR et al, 2011) (Figura 1)

Figura 1. Taxa de incidência estimada de tuberculose no mundo, em 2010.

Estimated TB incidence rates, 2010



Fonte: Organização Mundial de Saúde (2011)

Em 2010, foram estimados 8.8 milhões de casos incidentes de TB no mundo, com aproximadamente 1.4 milhão de mortes, sendo 350 mil entre os indivíduos portadores do

HIV. Em relação à mortalidade de coinfectados TB- HIV, 82% estão na região da África. Ainda este ano, foram notificados 5.7 milhões de casos de TB no mundo. Dos novos casos diagnosticados com TB pulmonar, 2.6 milhões eram bacilíferos (com presença do bacilo visualizado na microscopia do escarro) e 2.0 milhões de casos de TB com baciloscopia negativa. Menos de 5% dos novos casos de TB e daqueles reincidentes foram testados para a TB MDR na maioria dos países em 2010 (LANGE; MORI, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

1.2.2 Epidemiologia no Brasil

A TB no Brasil é uma das principais causas de morbimortalidade, ocupando o 19º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de TB no mundo, com o registro de 78.564 casos de TB em 2011. Destes casos, 65.643 foram da forma pulmonar, com aproximadamente 54,8% com baciloscopia positiva, 24,5% com baciloscopia negativa e 20,5% não foi realizada o exame (BRASIL, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011; RUFFINO-NETTO, 2002). Em 2009, foram notificados 10.286 casos de retratamento, sendo 50,6% relacionado às recidivas e 49,4% devido ao reingresso dos pacientes. Ao analisar os casos, nota-se que a região Sul (13,7%) apresenta a maior relação percentual, seguida pelas regiões Sudeste (13,4%), Nordeste (12,4%) e Norte (8,7%) (BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009). O Estado de Pernambuco notificou 4.890 casos de TB, com 4.231 casos da forma pulmonar, em 2011. Recife é a capital brasileira com maior taxa de mortalidade específica por TB com 7.7 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2011, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

1.3 Agente etiológico: *Mycobacterium tuberculosis*

A TB humana é causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria patogênica aeróbia que estabelece a infecção geralmente nos pulmões. As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, família Mycobacteriaceae, subordem Corynebacteriaceae, ordem Actinomycetales (CAMPOS, 2006). O gênero *Mycobacterium* consiste de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e mais de 80 espécies de micobactérias não-tuberculosas, incluindo patogênicas, oportunistas e espécies não-

patogênicas. (BRASIL, 2002; KONEMAN et al., 2001; SOINI; MUSSER, 2001). As espécies que constituem o complexo *Mycobacterium* são *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium africanum* que causam a tuberculose humana e animal. As micobactérias são álcool-ácido resistentes e, quando coradas a quente com fucsina ou auramina, retêm os corantes após lavagens com soluções de álcool e ácido. Sua parede é constituída principalmente por ácidos micólicos, formando uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dissecação, à descoloração por álcool e ácido e a diversos agentes químicos e antibióticos (BRASIL, 2002, 2008).

Vários elementos repetitivos de DNA que contribuem para a variação genética das cepas foram descobertos no *M. tuberculosis*. Um destes é o elemento IS6110, o mais abundante elemento IS (*Insertion sequence*) no genoma do bacilo. Faz parte da família IS3 que varia de 1 a mais de 25 cópias e possui 1.350 pares de bases (pb), estando integrado em vários sítios cromossômicos (ASSIS, et al., 2007; SAVELKOUL et al., 2006; THIERRY et al., 1990). Apesar de estudos relatando que muitas cepas de *M. tuberculosis* não possuem o alvo IS6110 (SCHERER et al., 2011), estudos de identificação de DNA realizados no Brasil não detectaram a presença dessas cepas, apresentando a grande maioria números elevados de cópia do IS6110 (CAFRUNE et al., 2006).

1.4 Transmissão

A bactéria é transmitida principalmente por indivíduo bacilífero através de gotículas contaminadas liberadas no ambiente pelo espirro, fala ou tosse e que entra no organismo pelas vias respiratórias estabelecendo uma infecção primária nos pulmões. Sua forma clínica é caracterizada principalmente pelo acometimento dos pulmões (TB pulmonar), podendo também atingir outros sítios anatômicos (TB extrapulmonar) ou ainda ocorrer de forma disseminada (TB miliar) (DUCATI et al., 2006; PANDOLFI et al., 2007).

A maior diferença entre a TB e outras infecções por micobactérias é que o *M. tuberculosis* é transmitido de pessoa a pessoa (SOINI; MUSSER, 2001). O reservatório principal é o homem e em algumas regiões, o gado bovino doente. Em geral, a fonte de infecção é o indivíduo com a forma pulmonar bacilífera da doença. Calcula-se que durante um ano, numa comunidade, um indivíduo bacilífero poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas. A imprecisão do rastreamento dos contatos em investigações tem sido destaque em alguns

relatórios que sugerem que o contato limitado ou casual pode ser suficiente para a transmissão do *M. tuberculosis*. (BRASIL, 2009; MATHEMA et al., 2006)

No prazo de 24 horas um indivíduo infectado pode expelir até 3,5 milhões de bacilos da TB, muito deles presentes em gotículas microscópicas que são eliminadas através das vias aéreas superiores. Estas minúsculas partículas podem flutuar por um período de até 8 horas, depositando-se em roupas, lenços, livros, móveis e na poeira. Em sua maioria, as gotículas médias são retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios através do mecanismo mucociliar. Os bacilos assim removidos são deglutidos, inativados pelo suco gástrico e eliminados nas fezes. Os bacilos que se depositam nas roupas, lençóis, copos e outros objetos dificilmente se dispersarão em aerossóis e, por isso, não desempenham papel importante na transmissão da doença. Eventualmente, as menores gotículas podem ser aspiradas por outros indivíduos, sendo que se não forem retidas podem atingir os bronquíolos respiratórios e os alvéolos, e iniciar o processo patológico. A TB é uma doença altamente contagiosa, principalmente levando-se em consideração que uma suspensão contendo de 1 a 10 bacilos é suficiente para causar uma infecção (BERTOLLI, 2001; BRASIL, 2002, 2009).

Os doentes bacilíferos são a principal fonte de infecção. Doentes com TB pulmonar e com baciloscopia negativa, mesmo que tenham resultado positivo na cultura, são muito menos eficientes como fontes de transmissão. As formas exclusivamente extrapulmonares não transmitem a doença (BRASIL, 2010, 2011).

1.5 Imunopatogenia

A progressão da infecção tuberculosa é fundamentalmente regulada pela competência do sistema imune do hospedeiro, que pode ter êxito através da eliminação microbiana imediata e/ou latência condicionada, ou pode falhar resultando no desenvolvimento da doença ativa (DUCATI et al., 2006). Uma vez que as partículas são inaladas e fagocitadas pelos macrófagos alveolares residentes, há uma ativa resposta do sistema imune celular do hospedeiro envolvendo citocinas e quimiocinas. A resposta imunológica do hospedeiro é caracterizada pela formação do granuloma que consiste primariamente de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* e células T. Em 10% dos indivíduos supostamente imunocompetentes, a infecção pode não ser contida e continuar a replicação bacilar. (CLARK-CURTISS; HAYDEL, 2003; MATHEMA et al., 2006).

Ao chegarem ao interior do pulmão, os bacilos serão fagocitados pelos macrófagos alveolares. Inicia-se assim, dentro do citoplasma do macrófago, um mecanismo de fusão do fagossoma contendo o *M. tuberculosis* com um lisossoma repleto de substâncias lesivas visando à destruição do bacilo tuberculoso. O macrófago, dependendo da virulência e da quantidade de bacilo fagocitado, pode logo impedir o desenvolvimento da infecção. Na maioria dos casos, o macrófago sozinho é incapaz de eliminar a micobactéria, precisando de apoio de outras células, principalmente dos linfócitos T que produzem citocinas que aumentam a capacidade do macrófago de matar a bactéria dentro do seu citoplasma. O linfócito T, além de produzir citocinas, é também uma arma efetora importante contra a micobactéria, pois ajuda na eliminação do macrófago menos potente no combate, o qual libera para o ambiente o bacilo, possibilitando que macrófagos mais eficientes o fagocitem e consigam controlar a infecção. Trata-se do próprio linfócito T fazendo uma ação efetora contra a micobactéria, ainda que de forma indireta (CAMPOS, 2006; SILVA; BOÉCHAT, 2004).

1.6 Controle e prevenção

A TB além de ser uma das mais sérias doenças infecciosas é considerada um problema na saúde pública devido ao alto risco de transmissão pessoa a pessoa e índices de morbidade e mortalidade (NDUGGA et al., 2004). O Ministério da Saúde (1999) define a TB como prioridade entre as políticas governamentais de saúde, estabelecendo diretrizes para as ações e fixando metas para o alcance de seus objetivos. As ações para o controle da TB no Brasil têm como meta diagnosticar pelo menos 90% dos casos esperados e curar pelo menos 85% dos casos diagnosticados (BRASIL, 2010).

O relatório de progresso (2006-2008) do plano global de combate à TB revelou que a taxa de detecção foi de 63%, ainda bem abaixo dos 78% estabelecido como meta para 2010, necessitando assim de novas ferramentas diagnósticas para ampliar a detecção. A meta de alcançar 85% de cura dos casos de TB descobertos levou a OMS a recomendar a adoção da Estratégia de Tratamento Diretamente Observado (DOTS – *Directly Observed Treatment Strategy*), que tem como objetivo garantir a adesão ao tratamento, reduzindo o risco de transmissão da doença na comunidade. A administração requer a supervisão da ingestão dos medicamentos, na unidade de saúde ou na residência, assegurando-se que o doente os tome em

uma única dose diária (RUFFINO-NETTO, 2002). A implementação da estratégia DOTS no Brasil tem apresentado dificuldades, o que remete à necessidade de se rever às estratégias para sua expansão (STOP TB, 2009).

Nas metas do milênio, espera-se reduzir, até 2015, a prevalência e a mortalidade por TB, em 50% em comparação com os seus níveis em 1990. A meta de detecção, no Brasil, vem sendo atingida e superada, o que não vem ocorrendo com a meta de cura, principalmente pelos altos percentuais de abandono que persistem em torno de 10 a 12% (HIJJAR, 2005). Assim a OMS recomendou que a a *Stop TB*, que foi lançada em 2006 como um aprimoramento da estratégia DOTS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011).

Em 2006, a *Stop TB* veio ao Brasil trazendo novas contribuições sobre as metas para o controle da TB, como: buscar a ampliação e aperfeiçoamento da estratégia DOTS de alta qualidade; reforçar o combate à co-infecção TB/HIV, TB-MDR e outros grupos vulneráveis; fortalecer o sistema de saúde vigente no País; promover maior engajamento dos profissionais de saúde e da sociedade civil; contar com o apoio dos portadores de TB, bem como das comunidades; permitir e promover as pesquisas operacionais. Nesse sentido, a criação do Fórum de Parceria contra a Tuberculose pelo Ministério da Saúde representou um marco definidor para o controle da TB no País, pois oficialmente se reconheceu o importante papel da mobilização social (DALCOMO; ANDRADE, PICON, 2007; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2006).

É estimado que a implementação da Estratégia *Stop TB* (1995-2008) tenha curado 41 milhões de pessoas com TB e evitado 6 milhões de mortes em todo o mundo. A taxa de detecção mundial de casos de baciloscopia positiva subiu de 15% para 61% durante o período da estratégia e a taxa de sucesso do tratamento aumentou de 77% para 87%. No entanto, apesar dessas importantes conquistas, a TB continua a aumentar e os esforços de controle precisa ser muito melhorado para a eliminação (definida como ≤ 1 caso de TB por milhão da população por ano) ser alcançada. Enquanto a incidência estimada da TB vem diminuindo globalmente desde 2004, a taxa atual de declínio (menos de 1% ao ano) é insuficiente para alcançar a eliminação da TB, em 2050, e os números absolutos de casos de TB continuam a crescer (STOP TB, 2011).

A vacinação com BCG faz parte das medidas de controle adotadas pelo Brasil. A Organização Mundial de Saúde recomenda dose única de BCG, ao nascimento. Esta recomendação se baseia na efetividade elevada da vacina, para proteção contra as formas graves e disseminadas da doença em crianças, sendo esta estratégia adotada pela maioria dos países em desenvolvimento. A variação do efeito protetor confere certo grau de incerteza

referente à vacina BCG contra a TB pulmonar, a forma mais comum da doença (BARRETO; PEREIRA; FERREIRA, 2006; RODRIGUES et al., 2007; STOP TB, 2008).

1.7 Diagnóstico

1.7.1 Diagnóstico clínico e laboratorial

As manifestações clínicas são geralmente o primeiro indício para o diagnóstico da TB, no entanto, são frequentemente inespecíficas e, portanto, o diagnóstico nem sempre é fácil. O sintoma mais comum na tuberculose pulmonar é a tosse persistente, por mais de quatro semanas. Sintomas sistêmicos são comuns, como febre, suores noturnos e perda de peso (HINRICHSEN, 2005; LANGE; MORI, 2010). Não raramente, a TB pode manifestar-se sob diferentes apresentações clínicas que podem estar relacionadas com o órgão acometido. Desta forma, outros sinais e sintomas, podem ocorrer e devem ser valorizados na investigação diagnóstica individualizada (BRASIL, 2011; CONDE, SOUZA, 2009).

Com relação à radiografia de tórax, deve ser solicitada para todo o paciente com suspeita clínica de TB pulmonar. Embora seja útil para o diagnóstico da TB pulmonar, pode apresentar imagens inespecíficas compatíveis com outras doenças. Além disso, até 15 % dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente pacientes imunodeprimidos (BRASIL, 2011; PICON et al., 1993).

A prova tuberculínica de Mantoux também faz parte dos métodos convencionais para o diagnóstico da TB e se baseia na reação celular desenvolvida após a inoculação intradérmica de um derivado protéico purificado do *M. tuberculosis* (PPD Rt23). Os indivíduos infectados desenvolverão, no local de aplicação uma reação de hipersensibilidade, que deverá ser lida em 72 a 96 horas (BETHLEM et al., 2000).

A resposta ao teste é classificada segundo o tamanho do nódulo cutâneo, sendo o indivíduo considerado: reator forte quando o tamanho da endureção local é ≥ 10 mm, geralmente devido à infecção, doença ativa ou vacinação recente com BCG; reator fraco de 5 a 9 mm podendo ser interpretado como infecção pelo *M. tuberculosis*, por micobactérias atípicas, ou pela vacinação prévia com BCG; e não reator (0 a 4 mm), indivíduos não infectados pelo bacilo ou imunodeprimidos. Cerca 70 a 80 % dos portadores de TB pulmonar com a doença ativa apresentam a prova tuberculínica ≥ 10 mm de endureção (BETHLEM et

al., 2000). Um resultado positivo, isoladamente, não permite distinguir o indivíduo infectado do doente e, portanto, não é suficiente para o diagnóstico de TB doença. Além disso, em áreas onde a vacinação de BCG é feita rotineiramente, sua interpretação pode ser prejudicada devido à memória imunológica induzida pela vacina. Ainda, apresenta importantes limitações para a decisão diagnóstica, em particular, nas áreas de elevada prevalência de infecção pelo bacilo de Koch (BK), como no nosso meio, onde a taxa do teste positivo oscila entre 25 % a 55 % na população geral (AFIUNE; NETO, 1993; CAMPOS, 2006; CASTELO FILHO et al., 2004).

A baciloscopia é um dos exames mais comumente utilizado em todo o mundo para detectar a TB pulmonar, por ser um método rápido, simples e barato e, portanto, muito útil para identificar pacientes bacilíferos. Consiste na visualização microscópica das micobactérias, após coloração convencional específica pelo Ziehl-Neelsen (ZN), ou pela coloração fluorescente com auramina-rodamina (BARRERA, 2007; HANNA, 1996; HOPEWELL, 2005; MELLO, 2001).

No adulto com suspeita de TB, a baciloscopia é largamente utilizada para o diagnóstico preliminar e acompanhamento do tratamento. No entanto, possui sensibilidade limitada, visto que, são necessários cerca de 5.000 - 10.000 organismos por ml da amostra para obtenção de resultado positivo, além de ser incapaz de diferenciar espécies de micobactérias, o que influencia na sua especificidade. A confiabilidade da leitura da baciloscopia é altamente dependente da experiência do profissional do laboratório, da qualidade da amostra e carga bacilar presente na amostra (BRASIL, 2002; CHIMARA et al., 2009; KONEMAN, et al. 2001). Os critérios para leitura e interpretação dos resultados da baciloscopia realizada com escarro pelo método de Ziehl-Neelsen são descritos: baciloscopia 1+, quando são encontrados de 10 a 99 BAAR em 100 campos; baciloscopia 2++, encontrado em média de 1 a 10 BAAR por campo, nos primeiros 50 campos observados; baciloscopia 3+++, mais de 10 BAAR por campo, nos primeiros 20 campos observados (BRASIL, 2008).

O resultado da baciloscopia é essencial para a avaliação clínica e epidemiológica, uma vez que fornece uma estimativa quantitativa do número de bacilos que estão sendo eliminados e, assim, uma visão sobre o grau de infectividade, bem como da gravidade da doença (ANI, 2008). Em pacientes com tuberculose pulmonar, a baciloscopia é limitada por sua baixa sensibilidade de 45% a 80% e em crianças, pacientes co-infectados pelo HIV e na TB extrapulmonar a variação da sensibilidade é de 35 a 70%. Possui, ainda, um baixo valor preditivo positivo (50% - 80%) para TB em ambientes em que micobactérias não-tuberculosas

são comumente isolados (BRASIL, 2010; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009; CONDE et al., 2009; ZAMARIOLI et al., 2009).

O isolamento e a identificação do *M. tuberculosis* através da cultura é a metodologia que permite a confirmação diagnóstica da TB, sendo considerada como o exame padrão-ouro. É um método usado na rotina diagnóstica, principalmente na detecção de casos suspeitos, em que a baciloscopia foi negativa (pela menor carga de bacilos na amostra) e de casos com risco de TB resistente através do teste de sensibilidade às drogas ou com suspeita da presença de micobactéria atípica. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença. O meio de cultura mais utilizado é o Lowenstein-Jensen (LJ), o qual é complexo, rico e propicia o crescimento da maioria das micobactérias (ARNOLD, 2007; BARRERA, 2007; BRASIL, 2010).

A cultura identifica o bacilo em mais de 80% dos casos de TB pulmonar, com especificidade de mais de 98%, requerendo cerca de 10-100 organismos por ml da amostra. A cultura possibilita diagnosticar casos de TB pulmonar, nos quais a eliminação bacilar não é suficiente para ser detectada pela baciloscopia. Entretanto, requer cerca de 3 a 8 semanas para obtenção do resultado, levando ao retardo do início do tratamento específico. Além da demora nos resultados, a cultura positiva para micobactérias deve ter sua espécie identificada por métodos bioquímicos ou moleculares. Atualmente, apenas 20% dos casos de retratamento no país, realizam o exame de cultura, valor ainda muito inferior ao recomendado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008; BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO, 2009; ROSSO, 2008).

No Brasil, cerca de 26% dos pacientes com TB pulmonar são tratados sem confirmação bacteriológica, com base apenas no quadro clínico-radiológico (ABADCO; STEINER, 1992; AMERICAN THORACIC SOCIETY, 2000; MELLO, 2001; SNIDER et al., 1988). Além disso, nos países em desenvolvimento, apenas um número limitado de laboratórios realizam cultura para micobactérias. Muitos laboratórios têm dificuldades em obter as instalações necessárias para o cultivo de micobactérias. (SANKAR et al., 2011)

Os métodos tradicionais bacteriológicos possuem sensibilidade insuficiente ou são lentos, especialmente para a detecção do *M. tuberculosis* em amostras clínicas paucibacilares (com pequeno número de bacilos). Isso pode ocasionar um atraso no tratamento bem como a realização de terapias inadequadas. Foi demonstrado que 35% a 52% dos pacientes tratados empiricamente para TB a partir do diagnóstico de presunção não tem efetivamente a doença. (GUERRA et al., 2008; NEGI et al., 2005)

Devido à crescente e rápida disseminação da TB, novos métodos de diagnósticos vêm sendo implementados e desenvolvidos. Novas técnicas foram introduzidas na prática laboratorial nos últimos anos, tais como o uso de instrumentos automatizados e semi-automatizados, como o BACTEC 460, um método radiométrico em que um aparelho detecta CO₂ radioativo liberado pela utilização do ácido palmítico presente no meio de cultura. Tanto detecta o crescimento das micobactérias em amostras clínicas em 2 ou 3 semanas, como pode ser uma prova rápida de sensibilidade as drogas. O uso de meios de cultura líquidos (não automatizados e mais baratos que o BACTEC) também diminui um pouco o tempo de crescimento das micobactérias a partir de espécimes biológicas. (BRASIL, 2002).

1.7.2 Diagnóstico molecular

As pesquisas com o *M. tuberculosis* têm avançado, possibilitando o conhecimento de sua estrutura genética, o que contribuiu com o desenvolvimento de novos métodos moleculares para sua detecção diretamente de amostras biológicas (NABIN et al., 2003). Vários elementos repetitivos de DNA, relacionados com a variação genética das cepas, foram descobertos no *M. tuberculosis*. Um destes é o elemento de inserção IS6110, o mais abundante elemento encontrado no genoma do bacilo. Faz parte da família IS3 que varia de uma a mais de 25 cópias e possui 1.350 pares de bases, estando presente em mais de 95% das cepas de *M. tuberculosis* (ASSIS et al., 2007; BARRERA, 2007; SAVELKOUL et al., 2006; THIERRY et al., 1990).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a síntese enzimática *in vitro*, de seqüências específicas de DNA através do uso de dois iniciadores (oligonucleotídeos) que hibridizam fitas opostas de DNA. A PCR é composta de três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão. Esse sistema torna possível a clonagem de seqüências específicas de DNA de tamanhos que variam de 50 a 2000 pares de bases (pb) sem a necessidade do uso de uma célula viva (EISENSTEIN, 1990; LIMA et al., 2009). É um método sensível para detecção de DNA ou RNA de micobactérias diretamente de espécimes clínicas, capaz de detectar menos de 10 bacilos por ml em diferentes amostras biológicas. Esta tecnologia tem diminuído o período de obtenção dos resultados de algumas semanas para 1 a 2 dias (CRUZ et al, 2011; DROBNIOWSKI et al., 2003). Numerosos ensaios de PCR foram descritos utilizando seqüências conservadas de DNA como alvo da

amplificação, para a detecção do complexo *M. tuberculosis* em espécimes clínicos de indivíduos adultos, mostrando a sua utilidade para o diagnóstico precoce da doença (LIMA et al., 2007; LIMA et al., 2009; PANDURO et al., 2000; PORTILLO-GÓMEZ; MORRIS; REBOLLO et al., 2006).

Em comparação com a baciloscopia, as técnicas moleculares possuem um maior valor preditivo positivo (>95%) em amostras cuja baciloscopia é positiva em ambientes em que micobactérias não-tuberculosas são comuns. Além disso, confirma rapidamente a presença do *M. tuberculosis* em 50 a 80% das amostras com baciloscopia negativa e cultura positiva. Os testes moleculares podem detectar a presença do *M. tuberculosis* semanas antes do resultado da cultura em 80 a 90% dos pacientes suspeitos de TB pulmonar, posteriormente confirmados por cultura (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2009; GUERRA et al., 2007; MOORE; GUZMAN; MIKHAIL, 2005).

1.7.3 PCR em tempo real

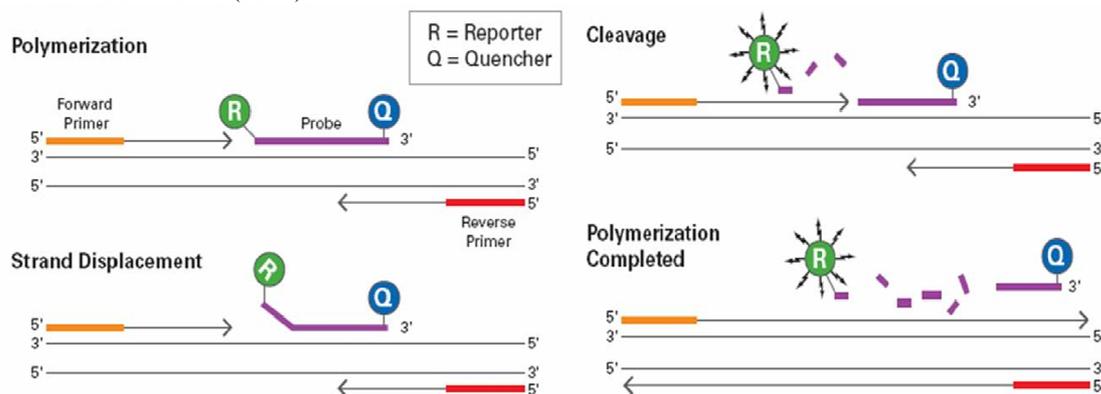
A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) é uma variante da PCR que tem sido usada para a detecção de vários organismos infecciosos. Utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação ao mesmo tempo em que ocorre a reação. Essa fluorescência é captada por moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, tais como: SYBR® Green, TaqMan®, Molecular Beacons (CARVALHO, 2008; COUTO-SANT'ANNA et al., 2004; GOMES, 2008). A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR, ou seja, a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado (KUBISTA et al., 2006)

Um corante bastante utilizado é o SYBR Green, que se trata de uma molécula assimétrica de cianina, que livre em solução não emite fluorescência, mas ligada a moléculas de DNA emite um forte sinal luminoso. O SYBR® Green é um corante que quando se liga a moléculas de dupla fita de DNA, aumenta sua emissão fluorescente. A intensidade dessa fluorescência é proporcional à carga inicial do indivíduo. Uma das desvantagens do uso desse tipo de corante é que ele se liga a qualquer fita dupla de DNA e não apenas ao produto-alvo. Isso pode ser contornado, analisando-se a curva de dissociação do produto. Cada produto tem pico de temperatura de dissociação específico, o que diferencia o produto-alvo de produtos

inespecíficos (KUBISTA et al., 2006; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001).

Outra forma de gerar fluorescência é através do uso de uma sonda, dirigida especificamente a uma região interna da sequência que se deseja amplificar, sendo um exemplo destas a TaqMan®. Esta possui um marcador fluorescente (*reporter*) na extremidade 5', capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor, em comprimento de onda diferente do original. Entretanto, na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por um receptor de sinal luminoso (*quencher*), presente na extremidade 3' da sonda. Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação, mas, durante a amplificação, a sonda que se hibridizou ao produto-alvo é clivada pela atividade da exonuclease da enzima Taq DNA polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante do *quencher* que não mais será capaz de absorver a luz emitida. Assim, ocorrerá um aumento na intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação do alvo (Figura 2). Por isto, os métodos que dependem de hibridização da sonda para produzir um sinal fluorescente geralmente são menos susceptíveis de obter resultados falso-positivos (CAVALCANTI, 2008; LOGAN; EDWARD; SAUNDERS, 2009; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001).

Figura 2: Representação da PCR em tempo real utilizando sonda Taqman em todas as etapas da reação.
Fonte: ASURAGEN (2011).



A qPCR realiza a quantificação dos ácidos nucléicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação, enquanto que na PCR convencional o resultado analisado corresponde à fase platô da reação. O ponto que

detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial, onde a intensidade da fluorescência é maior do que a fluorescência do *background* (ruído, calibração do aparelho), é denominado *Cycle Threshold (Ct)*. Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível do DNA baseado na emissão da fluorescência. Para a determinação do valor de *Ct* devem ser observados os valores dos desvios padrões das duplicatas visto que, quanto menor o desvio, melhor é o valor do *Ct* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005; GOMES, 2008; NOVAIS et al., 2006).

A curva-padrão relaciona-se às concentrações de DNA padrão. É por meio destes dados, ou seja, quantidades conhecidas de DNA, que o programa efetua a quantificação de DNA alvo nas amostras em teste (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). A curva-padrão também fornece o coeficiente angular da reta (*slope*), composta pelos pontos da curva. Este dado será importante para o cálculo da eficiência da amplificação (ϵ), pois uma alta eficiência está associada a uma inclinação de, aproximadamente, 3,32 para cada diluição de 10 do alvo. O *slope* de -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100% indicando que o número de moléculas amplificadas dobra a cada ciclo da PCR (KUBISTA et al., 2006).

As maiores vantagens da qPCR em relação à PCR convencional são a rapidez, a maior precisão, reprodutibilidade e acurácia. Além disso, a análise do produto final é feita sem a necessidade de manipulação do tubo durante o processamento, o que diminui consideravelmente o risco de contaminação, reduzindo resultados falso-positivos e falso-negativos (COUTO-SANT'ANNA et al., 2004; KIBIKI et al., 2007). Uma grande desvantagem da PCR convencional é que não é quantitativa, pois o rendimento final do produto não é primariamente dependente da concentração da seqüência alvo na amostra (LOGAN; EDWARD; SAUNDERS, 2009).

A aplicação da qPCR tem sido observada no diagnóstico, monitoramento da eficácia terapêutica, genotipagem para determinar resistência às drogas e identificação de espécies/subespécies de diferentes organismos (BROCCOLO et al., 2003; HELB et al., 2010; PARASHAR et al., 2006; SHRESTHA et al., 2003). O ensaio de PCR em tempo real para detecção de bactérias apresenta benefícios clínicos bastante notáveis para o paciente. Os resultados podem rapidamente informar ao médico sobre o estado de infecção do paciente, permitindo uma terapêutica mais específica e oportuna, com redução do tempo de internação hospitalar e prevenção do uso indevido de medicamentos, minimizando o potencial de cepas resistentes (MACKAY, 2004).

2 JUSTIFICATIVA

O Plano Nacional de Combate à Tuberculose enfatiza que o controle da doença compreende necessariamente o diagnóstico precoce. A perspectiva de um diagnóstico mais rápido, preciso e específico através de ferramentas moleculares têm se mostrado promissor na forma pulmonar da doença, onde aproximadamente 26,7% dos casos permanecem sem a confirmação diagnóstica, através dos métodos convencionais (MELLO, 2001). O diagnóstico convencional, através da utilização dos exames de rotina, ainda é insatisfatório, sendo um dos principais fatores que contribui para a manutenção dos elevados índices da doença no mundo. Apesar de ser curável e possuir tratamento específico, a TB ainda apresenta taxas elevadas de óbitos.

Diante de tal situação, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos sobre a utilização de novos métodos diagnósticos alternativos que contribuam para um resultado mais rápido e eficaz. Assim, esse estudo avaliou um sistema de detecção e quantificação de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* através da técnica de PCR em tempo real, como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico laboratorial de pacientes com suspeita de TB pulmonar. Portanto, a possibilidade de um diagnóstico precoce e eficaz certamente irá interferir na cadeia de transmissão do bacilo e, conseqüentemente, no controle da doença.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o desempenho do sistema desenvolvido por Broccolo et al (2003) utilizando a técnica de PCR em tempo real na detecção do alvo IS6110 do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar?

4 HIPÓTESE

A PCR em tempo real é uma técnica capaz de detectar o *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o desempenho do sistema de qPCR na detecção específica do alvo IS6110 do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de escarro de pacientes com tuberculose pulmonar.

5.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a população do estudo quanto aos critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais em pacientes com e sem tuberculose pulmonar;
- b) Avaliar o limite de detecção da qPCR com DNA genômico de cepa de referência de *Mycobacterium tuberculosis* em amostra de escarro de indivíduo sem tuberculose;
- c) Avaliar o desempenho da técnica de qPCR (especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo) utilizando a baciloscopia como padrão-ouro;
- d) Avaliar o desempenho da técnica de qPCR (especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo) utilizando a cultura como padrão-ouro;
- e) Avaliar o desempenho da técnica de qPCR (especificidade, sensibilidade, valores preditivos positivo e negativo) utilizando a cultura e/ou resposta clínica do paciente ao tratamento específico como padrão-ouro.

6 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

6.1 População e local de estudo

Os pacientes do estudo foram provenientes de ambulatórios e enfermarias do Hospital das Clínicas (HC/UFPE) e Hospital Otávio de Freitas (HOF/PE) localizados na região metropolitana do Recife/PE. Os hospitais citados realizam atividades assistenciais, de ensino e residência médica. O diagnóstico clínico e tratamento específico do paciente com tuberculose foram realizados pelo médico acompanhante de cada serviço público de saúde.

Os exames laboratoriais de rotina foram realizados no laboratório de cada instituição de saúde e a análise molecular das amostras clínicas foi realizada pelo pesquisador no Laboratório de Imunoepidemiologia do Departamento de Imunologia e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM/Fiocruz.

6.2 Desenho do estudo

Foram selecionados 165 pacientes com idade superior a 15 anos, de ambos os sexos, com suspeita de tuberculose pulmonar que procuraram os serviços de saúde acima citados para atendimento clínico e laboratorial. É um estudo de ensaio clínico de validação, prospectivo e duplo-cego, em que o diagnóstico final do paciente só era disponibilizado à equipe do laboratório após todo o processamento laboratorial das amostras clínicas e a conclusão de análise dos dados.

6.3 Casuística

Os pacientes considerados suspeitos de ter TB foram aqueles que apresentaram dois ou mais dos seguintes sintomas - perda de peso, imagem radiológica pulmonar alterada, tosse por mais de 15 dias, febre prolongada não esclarecida, sudorese noturna. Após definição diagnóstica, os pacientes foram classificados como segue:

- a) **Grupo 1 - TB pulmonar:** quadro clínico e/ou radiológico compatível com TB ativa, isolamento do *M. tuberculosis* em amostra clínica através da cultura, ou melhora clínica evidente após tratamento específico (ao final dos tratamento);

- b) **Grupo 2 - Não TB:** Pacientes com afecções pulmonares inespecíficas, diagnosticados pelo médico acompanhante do serviço de saúde e exames laboratoriais de baciloscopia e/ou cultura negativos.

6.4 Critérios de definição de caso de TB Pulmonar: Padrão – ouro

Para o estudo foi estabelecido como definição de caso de TB pulmonar a presença do *M. tuberculosis* na cultura em meio específico e/ou melhora clínica evidente após o final do tratamento específico, segundo o médico acompanhante do serviço de saúde.

Também foram avaliados, isoladamente, diferentes padrões-ouro:

- a) Visualização de bacilos álcool-ácido resistentes na baciloscopia;
- b) Presença do *M. tuberculosis* na cultura em meio específico.

6.5 Critérios de exclusão

Os pacientes cujo tratamento para TB já tinha sido iniciado ou que não concordaram em participar da pesquisa.

6.6 Critérios de Perda

Pacientes cujas amostras biológicas coletadas foram insuficientes para o processamento no laboratório, impossibilidade de repetição da PCR, cultura contaminada ou o diagnóstico final não foi esclarecido.

6.7 Considerações éticas

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre a pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, em duas vias, referente à sua participação (Apêndices A e B). Caso o paciente fosse menor de idade, o responsável pelo mesmo poderia assinar o termo para a coleta do material biológico e participação na pesquisa. As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais relevantes de cada paciente foram registradas em uma ficha previamente elaborada e depositadas em um banco de dados, para permitir as análises

estatísticas (Apêndice B). O acompanhamento e tratamento destes pacientes foram feitos pelo médico responsável. O presente projeto teve parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM nº 086/2010 (Anexo A).

6.8 Métodos de processamento das amostras biológicas

6.8.1 Coleta e descontaminação das amostras de escarro

Foram coletados de 1-5 ml de escarro obtido através de eliminação espontânea em tubo seco rosqueado e estéril, em uma única amostra com o paciente em jejum, ao acordar. As amostras coletadas foram estocadas entre 4 a 8° C, não mais que 24 horas e transportadas para o CPqAM para serem processadas. A descontaminação foi realizada seguindo o protocolo do Método de Petroff (NaOH 4%) (BARRETO, 1994; BRASIL, 2008).

6.8.2 Baciloscopia

O protocolo de coloração pelo método de Ziehl-Neelsen para a identificação e quantificação dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) foi realizado pelos técnicos do laboratório central Julião, de acordo com as normas técnicas do Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008).

6.8.3 Cultura e Identificação de micobactérias em meio Löwenstein-Jensen

Após descontaminação, 0.2ml do sedimento foram semeados em três tubos contendo o meio Löwenstein-Jensen: um tubo de meio Löwenstein-Jensen (simples), um tubo de meio Löwenstein-Jensen com PNB (ácido para-nitrobenzóico) e um tubo de meio Löwenstein-Jensen com TCH (Hidrazida do ácido 2 carboxílico). Os tubos foram colocados em estufa a 37°C onde eram lidos uma vez por semana durante 8 semanas ou até quando ocorresse o crescimento de colônias. Estes meios passaram por testes de esterilidade (estufa a 37° C sem inoculação de amostra) e controle de qualidade do meio (inoculação de cepa de referência H37Rv de *M. tuberculosis*). Para a diferenciação das espécies de micobactérias do complexo *M. tuberculosis* das micobactérias não tuberculosas foram realizados os testes

bioquímicos: teste de inibição de crescimento em meio com ácido p-nitrobenzóico (PNB), inibição de crescimento em meio com Hidrazida do ácido tiofeno 2-carboxílico (TCH), acumulação de Niacina e catalase termoestável a 68° C. A cultura foi realizada por um técnico do laboratório de Imunoepidemiologia responsável unicamente por este método, segundo o Manual Nacional de Vigilância da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008), sendo duplo-cego.

6.8.4 Extração e purificação de DNA de amostras clínicas

A extração de DNA das amostras de escarro foi efetuada com o *kit* QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, foi adicionado 20 µl da proteinase K a uma alíquota de 200 µl da amostra previamente preparada (item 6.4.1). Em seguida, 200 µl do Buffer AL foi acrescentado à amostra e homogeneizada no vórtex por 15s, sendo então incubada em banho-maria a 56 °C por 10 minutos. Posteriormente, foi submetida à centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. Após a centrifugação, adicionou-se 200 µl de etanol (96 – 100%) à amostra e esta foi mixada no vórtex por 15 segundos. Depois, foi novamente centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto. A amostra foi transferida para a coluna específica do *kit*, e centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor do *kit*, e descartado o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se à coluna 500 µl do Buffer AW1. Realizou-se a centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor e foi descartado o tubo contendo o filtrado da centrifugação. Adicionou-se o Buffer AW2 e a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 3 minutos. Em seguida, a coluna foi colocada em um novo tubo coletor e descartado o velho tubo contendo o filtrado. Novamente centrifugou-se a amostra a 14.000 rpm por 1 minuto. A coluna foi colocada em um tubo previamente identificado. Adicionou-se 200 µl do Buffer AE na coluna contendo a amostra. Após esta etapa, a amostra foi deixada em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente para melhor concentração do DNA. Por último, foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto, sendo descartada a coluna e guardado o tubo contendo a amostra.

6.8.5 Curva de diluição utilizando cepa de referência do *Mycobacterium tuberculosis* em amostra de escarro.

Foi coletada uma amostra de escarro de indivíduo sintomático respiratório, porém com diagnóstico final definido como “não TB”, de acordo com os exames laboratoriais negativos (baciloscopia e cultura) para a doença e confirmado pelo médico do serviço de saúde.

Adicionou-se uma quantidade conhecida de cepa de referência de *M. tuberculosis* (H37Rv) em uma alíquota da amostra de escarro e foram realizadas diluições consecutivas, de fator 10, variando de 3×10^7 (tubo nº 1 da Escala de Mc Farland) a 3×10^0 bacilos/ml, para avaliar a menor quantidade de DNA genômico detectado em amostra de escarro pela qPCR. A sensibilidade do ensaio foi definida pela amplificação da menor diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em tubo sem DNA (controle negativo da reação). A análise molecular foi realizada através do sistema ABI Prism 7500.

6.8.6 Critérios de positividade da amostra de escarro na qPCR

Para o estabelecimento de positividade de amostra de escarro (detecção do alvo IS6110 de *M. tuberculosis* na qPCR), foram definidos os seguintes critérios:

- a) o valor de *Ct* correspondente à amplificação da última diluição (3×10^0 bacilos/ml) obtida através de curva de amplificação, referente ao item 6.8.5;
- b) obtenção de duplicatas homogêneas.

6.9 Método molecular

6.9.1 Alvo molecular

A seqüência de inserção IS6110 foi o alvo para a PCR em tempo real que é encontrada especificamente em cepas do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (HELLYER et al.1996).

6.9.2 Condições da PCR em tempo real

As condições da técnica foram baseadas nos princípios utilizados por Broccolo et al., (2003), utilizando os oligonucleotídeos TAQM3 (5'-AGGCGAACCCCTGCCCAG-3') e TAQM4 (5'-GATCGCTGATCCGGCCA-3'). A PCR em tempo real foi processada através do sistema ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, CA, US) usando a sonda específica *TaqMan* 5'-TGTGGGTAGCAGACCTCACCTATGTGTCGA-3' (e ROX como referência passiva).

Os produtos de PCR foram detectados pela fluorescência emitida pela sonda *TaqMan* ao ser degradada pela atividade de exonuclease 5'-3' da enzima polimerase. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95° C por 10min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15s; anelamento e amplificação a 60° C por 1 min, utilizando 12,5 µl do *kit TaqMan*, 1µl de cada oligonucleotídeo, 1µl da sonda e 9µl de DNA extraído de amostra clínica, adicionando água mili-Q, perfazendo o volume final de 25µl.

Foram usados controles negativos (amostra sem DNA e com água) com o objetivo de detectar a presença de resultados falso-positivos. Em todas as reações utilizou-se uma curva de diluição de bacilos a partir de cepa de referência (H37Rv) do *M. tuberculosis* como controle positivo, variando de 3×10^7 a 3×10^0 bacilos/ml. Os experimentos foram realizados em duplicata. A análise, interpretação e registro dos resultados realizaram-se através do software ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4 e 2.0.4).

6.9.3 Avaliação das amostras pelo gene constitutivo da β -actina

Para avaliação da presença de DNA nas amostras, obtido na etapa de extração, foi realizada qPCR do gene constitutivo da β -actina. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 95° C por 10min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95° C por 15s; anelamento e amplificação a 60° C por 1 min, utilizando 12,5 µl do *kit TaqMan*, 2,5µl do *kit TaqMan Endogenous Control* (500nM da sonda e 300nM dos oligonucleotídeos) e 9µl de DNA extraído de amostra clínica, adicionando água mili-Q, perfazendo o volume final de 25µl. Foram usados controles negativos com o objetivo de detectar a presença de resultados falso-positivos. Os experimentos foram realizados em duplicata. A análise, interpretação e registro dos resultados foram realizadas através do software ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4 e 2.0.4).

6.10 Análise Estatística

Para a elaboração deste projeto, foi realizado um cálculo amostral no programa estatístico Epi-Info, considerando a frequência esperada do evento de interesse de 85% (KIBIKI et al., 2007), com precisão de 5% e população alvo de 4.048 pacientes com tuberculose pulmonar. A amostra calculada resultou em 134 indivíduos ao nível de confiança de 95.0%.

Na análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste kappa para a análise de concordância o teste qui-quadrado para a análise de associação, e quando necessário o teste de Fisher. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ($p < 0.05$). Para avaliação dos testes foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) do teste como descrito em Ferreira e Ávila (2001). O índice *kappa* foi utilizado para verificar a concordância entre diagnósticos de dois especialistas, em que se avalia a precisão de um método diagnóstico comparando-o com um diagnóstico-referência (ARANGO, 2009). Dados e resultados foram introduzidos e analisados pelo programa SPSS 18.0 for Windows.

7 RESULTADOS

7.1 Análise do perfil clínico, epidemiológico e laboratorial dos indivíduos participantes do estudo.

No estudo foram avaliados 165 indivíduos com suspeita clínica de TB pulmonar. Do total de indivíduos selecionados, 66 (40.0 %) apresentaram diagnóstico final de TB pulmonar e 99 (60.0 %) foram portadores de outras doenças respiratórias, sendo classificados como grupo “não TB”. A idade variou de 17 a 92 anos, cuja média foi de 41 anos (\pm 14.88). No grupo com TB pulmonar (n = 66), 51 indivíduos foram do sexo masculino (77.27 %) e 15 do sexo feminino (22.73 %). Em relação à idade, 53 pacientes estavam na faixa etária de 17 a 50 anos, e 13 na faixa etária com mais de 50 anos. Quanto à procedência, 51 (77.27%) pacientes foram provenientes de ambulatório e 15 (22.73 %) de enfermarias de instituições do Sistema Único de Saúde. Quarenta e sete (71.22 %) apresentaram alterações no parênquima pulmonar no raio-x, 7 (10.6%) o raio-x foi normal e 12 (18.18 %) não realizaram o exame. A baciloscopia foi positiva em 62 (93.9 %) e a cultura confirmou o diagnóstico de TB pulmonar em 62 pacientes (Tabela 1). No grupo diagnosticado como “não TB”, 45 (45.45%) indivíduos foram do sexo masculino e 54 (54.55 %) do sexo feminino. Quanto à idade dos participantes, 67 (67.67%) tinham até 50 anos e 32 (32.33%) indivíduos tinham mais de 50 anos. Em relação à procedência, 87 (87.88%) pacientes foram provenientes de ambulatório e 12 (12.12 %) de enfermarias dos serviços de saúde. Dezesesseis indivíduos (16.16 %) apresentaram alterações compatíveis com outras enfermidades respiratórias, 78 (78.78 %) apresentaram o exame normal e 5 (5.05 %) não fizeram o referido exame. Quanto aos exames bacteriológicos, 92 (92.9 %) indivíduos apresentaram baciloscopia negativa e 99 foram negativos na cultura (Tabela 2).

Tabela 1. Características clínicas e epidemiológicas dos 66 indivíduos diagnosticados como “TB doença”.
(continua)

TB doença (66 pacientes)	N	%
Sexo		
Masculino	51	77.27
Feminino	15	22.73
p < 0,0001		
Idade		
De 17 a 50 anos	53	80.30
De 51 a 92 anos	13	19.70
p = 0,074		

Tabela 1. Características clínicas e epidemiológicas dos 66 indivíduos diagnosticados como “TB doença”.
(conclusão)

TB doença (66 pacientes)	N	%
Procedência		
Ambulatório	51	77.27
Enfermaria	15	22.73
p= 0,071		
Radiografia de Tórax		
Alterada	47	71.22
Sem alterações específicas	7	10.60
Não realizado	12	18.18
p < 0,0001		
Exames bacteriológicos		
Baciloscopia positiva	62	93.93
Cultura em meio LJ positiva	62	93.93
p < 0,0001		

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 2. Características clínicas e epidemiológicas dos 99 indivíduos diagnosticados como “Não TB”.

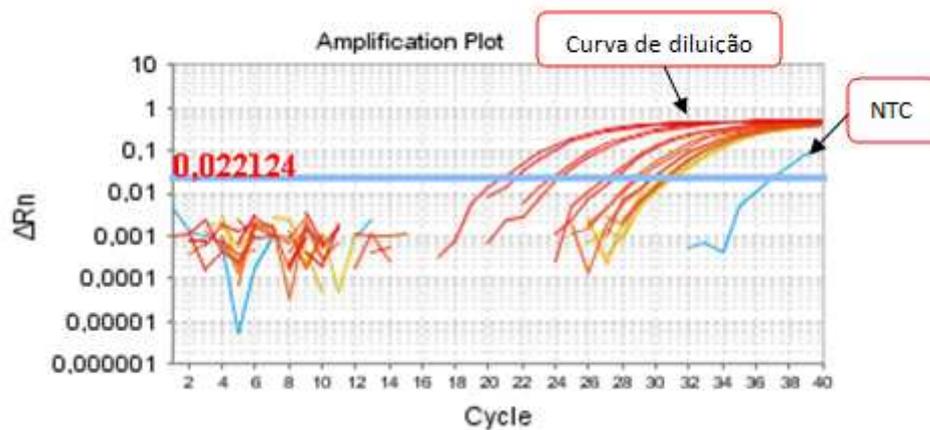
Não TB (99 pacientes)	N	%
Sexo		
Masculino	45	45.45
Feminino	54	54.55
p < 0,0001		
Idade		
De 17 a 50 anos	67	67.67
De 51 a 92 anos	32	32.33
p = 0,074		
Procedência		
Ambulatório	87	87.88
Enfermaria	12	12.12
p= 0,071		
Radiografia de Tórax		
Alterada	16	16.16
Sem alterações específicas	78	78.78
Não realizado	5	5.06
(p < 0,0001)		
Exames bacteriológicos		
Baciloscopia negativa	92	92.92
Cultura em meio LJ negativa	99	100
(p < 0,0001)		

Fonte: elaborado pela autora

7.2 Avaliação do limite de detecção da qPCR através de curva de diluição de cepa de referência de *M. tuberculosis* (H37Rv) em amostra de escarro

Observou-se que o sistema foi capaz de detectar até 3 bacilos/ml ou 15 fg de DNA, que amplificou no ciclo (*Ct*) 30, sendo este utilizado como limite máximo de positividade nas amostras de escarro (Figura 3).

Figura 3 - Gráfico de amplificação de qPCR utilizando o sistema TaqMan com DNA de cepa de referência de *M. tuberculosis* (H37Rv), realizado a partir de curva de diluição com amostra de escarro adicionada de bacilos viáveis.



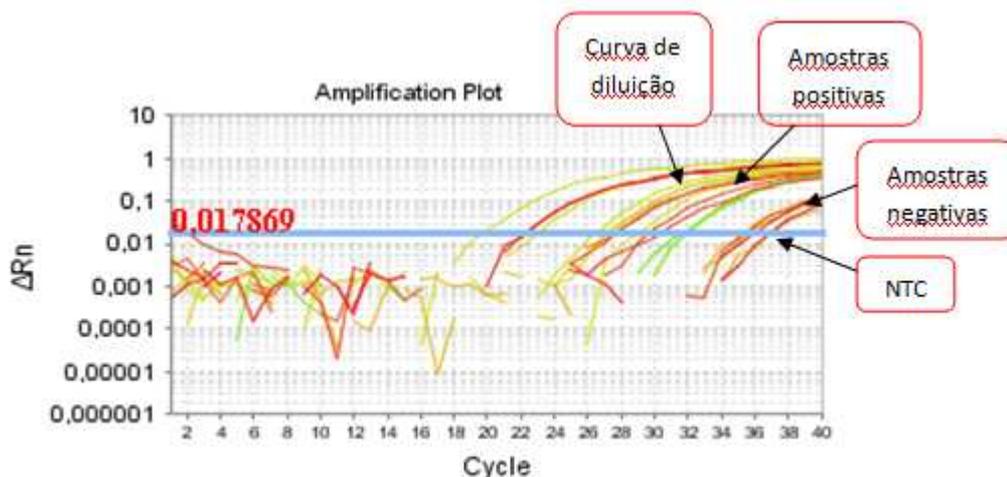
Fonte: APPLIED BIOYSTEMS, 2011.

Nota: Curva de diluição consecutiva de fator 10, variando de 3×10^7 a 3×10^0 bacilos/ml. O limite máximo de detecção é de 3 bacilos/ml, correspondente ao *Ct* 30.

7.3. Avaliação da técnica de qPCR em amostras de escarro coletadas de pacientes suspeitos de TB pulmonar

Foram analisadas 165 amostras de escarro de pacientes com suspeita de TB pulmonar. Destas amostras, 60 (36.4 %) foram positivas na qPCR e 105 (63.6 %) amostras foram negativas (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico de amplificação de qPCR utilizando o sistema *TaqMan* com amostras de escarros de pacientes diagnosticados com TB e sem TB. Amostras de escarro foram positivas do Ct 18 ao 30.



Fonte: APPLIED BIOSYSTEMS, 2011.

Nota: Análise molecular realizada utilizando curva de diluição de 3×10^7 a 3×10^0 bacilos/ml.

7.4 Avaliação do desempenho da qPCR em amostras de escarro utilizando a baciloscopia como padrão-ouro

A sensibilidade da qPCR em amostras de escarro utilizando a baciloscopia como padrão-ouro foi de 79.7 % (IC= 70.2 a 89.2) e a especificidade de 94.8 % (IC= 90.3 a 99.2) (Tabela 3 e 6). A baciloscopia e a qPCR apresentaram uma boa concordância entre os testes, demonstrados pelo índice de Kappa de 0.76. O valor de p para ambos os testes foi altamente significativo ($p < 0,0001$ pela correção de Yates).

Tabela 3 - Desempenho da técnica de qPCR nos 165 pacientes com suspeita de TB pulmonar utilizando a baciloscopia como padrão-ouro.

qPCR	Baciloscopia		Total
	TB doença	Não TB	
Positivo	55	5	60
Negativo	14	91	105
Total	69	96	165

Fonte: elaborado pela autora

Nota: S = 79.7 %; E = 94.8 %; VPP = 91.7 %; VPN = 86.7 %

7.5 Avaliação do desempenho da qPCR em amostras de escarro utilizando a cultura como padrão-ouro

Considerando a cultura como o padrão-ouro, a sensibilidade e especificidade das amostras de escarro avaliadas foram de 87.1 % (IC= 78.8 a 95.4) e 94.2 % (IC= 89.7 a 98.7), respectivamente (Tabela 4 e 6). A cultura e a qPCR apresentaram uma elevada concordância entre os testes, demonstrados pelo índice de Kappa de 0.82 ($p < 0,0001$).

Tabela 4- Desempenho da técnica de qPCR nos 165 pacientes com suspeita de TB pulmonar utilizando a cultura como padrão-ouro.

qPCR	Cultura		Total
	TB doença	Não TB	
Positivo	54	6	60
Negativo	8	97	105
Total	62	103	165

Fonte: elaborado pela autora.

Nota: S = 87.1 %; E = 94.2 %; VPP = 90.0 %; VPN = 92.4 %

7.6 Avaliação do desempenho da qPCR em amostras de escarro utilizando a cultura e/ou resposta ao tratamento específico como padrão-ouro

A sensibilidade da qPCR em amostras de escarro utilizando a cultura e/ou resposta ao tratamento (TTO) específico como padrão-ouro foi de 87.9 % (IC= 80.0 a 95.8) e a especificidade de 98.0 % (IC= 95.2 a 100.8) (Tabela 5 e 6). A cultura e/ou resposta ao TTO e a qPCR apresentaram uma elevada concordância entre os testes, demonstrados pelo índice de Kappa de 0.87. O valor de p foi altamente significativo ($p < 0,0001$ pela correção de Yates).

Tabela 5 - Desempenho da técnica de qPCR nos 165 pacientes com suspeita de TB pulmonar utilizando a cultura e/ou resposta ao tratamento específico como padrão-ouro.

qPCR	Cultura e/ou resposta ao TTO		
	TB doença	Não TB	Total
Positivo	58	2	60
Negativo	8	97	105
Total	66	99	165

Fonte: elaborado pela autora

Nota: S= 87.9 %; E = 98 %; VPP= 96.7%; VPV = 92.4 %

7.7 Avaliação do desempenho da qPCR em comparação com os métodos convencionais de diagnóstico utilizados como padrão – ouro isoladamente

O desempenho da qPCR foi avaliado utilizando a baciloscopia isoladamente, cultura isoladamente, cultura e/ou a resposta ao tratamento específico como padrões-ouro. A qPCR apresentou sensibilidade de 79.7%, especificidade de 94.8% e índice kappa de 0.76 ao se utilizar a baciloscopia como padrão-ouro. Quando a cultura foi considerada como padrão-ouro, a qPCR obteve sensibilidade de 87.1%, especificidade de 94.2% e índice kappa de 0.82. A sensibilidade, especificidade e índice kappa da qPCR foram de 87.9 %, 98 %, e 0.87, respectivamente, ao utilizar a cultura e/ou resposta ao tratamento como padrão-ouro (Tabela 6).

Tabela 6 - Desempenho da técnica de qPCR nos 165 pacientes com suspeita de TB pulmonar em comparação com os métodos convencionais de diagnóstico utilizados como padrão – ouro isoladamente

Padrão-ouro	qPCR		
	Sensibilidade	Especificidade	Índice kappa
Baciloscopia	79.7 %	94.8 %	0.76
Cultura	87.1 %	94.2 %	0.82
Cultura e/ou resposta ao tratamento	87.9 %	98 %	0.87

Fonte: elaborado pela autora

8 DISCUSSÃO

A confirmação diagnóstica da TB pulmonar continua sendo um desafio diário para os clínicos e microbiologistas, por carência de testes laboratoriais que apresentem bom desempenho na detecção do bacilo (KHÉCHINE; DRANCOURT, 2011). A baciloscopia e a cultura são os exames atualmente preconizados pelo Ministério da Saúde para confirmar os casos suspeitos de tuberculose pulmonar (BRASIL, 2010, 2011). Em alguns casos, nos quais o diagnóstico laboratorial não é conclusivo, a confirmação diagnóstica é feita baseada na associação de critérios clínicos, epidemiológicos e resposta a terapêutica específica. (KHÉCHINE; DRANCOURT, 2011).

A pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pelo método de Ziehl-Nielsen, por ser uma técnica simples e de baixo custo, é a mais utilizada, permitindo detectar de 60% a 80% dos casos de tuberculose pulmonar (BRASIL, 2011). Por outro lado, a cultura, considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da tuberculose, é um método de elevada especificidade e maior sensibilidade no diagnóstico da doença. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença. No entanto, são necessárias de 4 a 8 semanas para a obtenção do resultado (BRASIL, 2011).

Devido aos problemas na confirmação diagnóstica, no Brasil, cerca de 26,7% dos pacientes adultos são tratados como casos de TB pulmonar, sem confirmação bacteriológica no momento da adoção da terapêutica (MELLO, 2001). A estimativa para os próximos 20 anos é que o aumento da detecção de casos possa reduzir a incidência de TB em 41%, (CHAGAS et al., 2010) além de minimizar a emergência de cepas resistentes aos antibióticos utilizados naqueles pacientes que mesmo sem diagnóstico, iniciam o tratamento.

Observa-se que os métodos laboratoriais tradicionais apresentam falhas e, por isso, atualmente técnicas moleculares vem se destacando, pois são mais rápidas, específicas e sensíveis. Desta forma, na tentativa de contribuir para um diagnóstico rápido e seguro da tuberculose, e tentar superar as dificuldades encontradas com os testes tradicionais, um sistema baseado em PCR em tempo real foi avaliado nesta pesquisa.

Em relação à casuística estudada, observou-se uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) em relação ao sexo dos indivíduos participantes. O sexo masculino foi o mais frequente, e entre os doentes, a proporção foi de três casos masculinos para um feminino, concordando com o encontrado na literatura (SEVERO; LEITE, 2005). Dados semelhantes foram relatados em outros estudos, ou seja, adoecem por tuberculose mais

homens do que mulheres, talvez devido a diferenças na exposição ao bacilo, ao modo de vida e às condições de trabalho (BETHLEM, 1975; CAVALCANTI et al., 2006).

A faixa etária foi dividida em 2 grupos: de 17 a 50 anos referente a população economicamente produtiva e com mais de 50 anos, sendo o grupo menos ativo. Observou-se que ocorreu uma predominância elevada dos participantes no grupo até 50 anos e entre os doentes (80.3%), com a frequência acompanhando o padrão nacional de incidência da doença, apesar do resultado não ter sido estatisticamente significativo. Estudo mostra que em 18,5 % dos casos, as mortes ocorrem em adultos na faixa etária de 15 a 59 anos, ou seja, a fase mais produtiva da população (SILVA, 2002).

A maioria da população estudada foi proveniente de ambulatórios que realizam busca ativa de sintomáticos respiratórios, apesar de não ter sido observada correlação estatística significativa entre a frequência de pacientes de enfermaria e ambulatório. A maioria dos pacientes suspeitos de TB recebem atendimento a nível ambulatorial, e quando são diagnosticados como doentes, o tratamento pode ser realizado a domicílio, com a supervisão e acompanhamento de agentes de saúde. Os pacientes internados geralmente apresentam estado mais grave, como os portadores de HIV, usuários de drogas ou moradores de rua (BRASIL, 2011).

A radiografia de tórax é um método diagnóstico importante na investigação da tuberculose. No presente estudo, 10.6% dos indivíduos com TB pulmonar não apresentaram alterações radiológicas, concordando com a literatura em que o percentual alcança até 15% dos casos (BRASIL, 2011). Nos pacientes diagnosticados sem TB, observa-se que aproximadamente 16.6% apresentaram alterações na radiografia, justificada por o exame por serem inespecíficas e compatíveis com outras doenças respiratórias (PICON et al., 1993).

Todos os pacientes do estudo realizaram baciloscopia e cultura, sendo 93.93% com resultado positivo em ambos os testes no grupo com TB pulmonar. Apesar de o resultado ter sido coincidente nos exames bacteriológicos, não foram os mesmos pacientes. Nos indivíduos definidos como não TB, 92.92% apresentaram baciloscopia negativa e 100% apresentaram cultura negativa.

Neste estudo, foi observado que a PCR em tempo real obteve um excelente limite de detecção, de até 3 bacilos/ml do *Mycobacterium tuberculosis*. Comparando-se com outros estudos, Portillo-Gómez et al. (2000), através da PCR simples, encontraram um limite de detecção de DNA genômico de *M. tuberculosis* de um bacilo ou 5fg de DNA, quantidade similar à encontrada nesta pesquisa. Lima et al. (2009) obtiveram uma sensibilidade maior de detecção de 0,1 fg (menos que um bacilo) com a técnica de Nested-PCR, provavelmente por

ocorrer em duas reações consecutivas utilizando 2 pares de oligonucleotídeos, o que aumenta tanto a sensibilidade quanto a especificidade da técnica. Entretanto, é importante salientar que os sistemas de PCR convencionais referidos exigem o processamento pós-PCR através de eletroforese para obtenção do resultado, o que resulta em menor precisão e reprodutibilidade da técnica. Diferentemente, a PCR em tempo real avaliada no estudo, além de ser mais rápida e específica, os resultados são obtidos simultaneamente ao processamento das amostras. Issa et al. (2012), utilizando a técnica de qPCR, encontraram uma sensibilidade de detecção de 10 pg (equivalente a 2.000 bacilos/ml), limite abaixo do encontrado no presente trabalho, possivelmente por ter se utilizado o alvo *gyrB*, diferente daquele selecionado em nosso estudo. Broccolo et al. (2003), utilizando o mesmo sistema de PCR em tempo real deste trabalho, obtiveram um limite maior de detecção, de 1fg, provavelmente por ter se avaliado o sistema com DNA plasmidial diluído em água, livre de inibidores presentes na amostra clínica.

Os ensaios de PCR em tempo real devem ser de qualidade controlada utilizando o limite de detecção como uma das medidas para sua eficiência. Ensaios com limite de detecção menor, em torno de 10 fg/ μ l têm o potencial de ser aplicado em amostras clínicas por conseguirem detectar uma quantidade de DNA muito pequena (SANKAR et al., 2011). Assim, no presente estudo o excelente limite de detecção encontrado através da qPCR, permitiu a utilização da técnica com amostras clínicas, inclusive em pacientes paucibacilares.

Para o bom desempenho da PCR, vários fatores devem ser levados em consideração, sobretudo a descontaminação das amostras e o método de extração de DNA. A desproporção entre a velocidade de crescimento das micobactérias e de outras bactérias torna necessária uma descontaminação das amostras clínicas contendo microbiota associada, que, quando presente, pode impedir a multiplicação dos bacilos levando a um resultado falso-negativo (THORTON et al., 1998). O uso de alguns agentes descontaminantes juntamente com agentes mucolíticos (utilizados para liquefazer os restos orgânicos e liberar os bacilos intracelulares do escarro) podem levar a uma perda de viabilidade do bacilo (KENT; KUBICA, 1985). Por isto, optou-se pela descontaminação com o método de Petroff, o qual utiliza hidróxido de sódio a 4%, um dos métodos mais empregados por destruir grande parte de bactérias contaminantes, além de liquefazer o material. Na etapa de descontaminação, as manipulações da amostra podem causar erros de amostragem, tais como: diluição de amostra inadequada, a aspiração acidental do pellet ao remover o sobrenadante e contaminação cruzada (LEMAITRE et al., 2004; YAJKO et al., 1995).

Na extração, etapa seguinte à descontaminação, deve-se conseguir realizar uma eficiente liberação de ácidos nucleicos das amostras, remoção dos possíveis inibidores da PCR e evitar a degradação dos ácidos nucleicos, a fim de assegurar uma concentração adequada de DNA. Isso é relativamente fácil para alvos de mamíferos, porém muito mais difícil e inconsistente para alvos em bactérias, fungos, protozoários e parasitas (KALTENBOECK; WANG, 2005). Na extração de amostras de escarro selecionou-se o *kit* QIAamp DNA, onde o objetivo foi melhorar a extração provavelmente para ganhar qualidade na amplificação do DNA através da PCR em detrimento à perda de bacilos. Frequentemente, o fator limitante na detecção de baixo número de cópias, como é o caso do *M. tuberculosis*, é a preservação e recuperação do alvo na extração do ácido nucleico, visto que o desempenho da técnica de PCR pode sofrer influência de substâncias inibidoras presentes nas amostras (KALTENBOECK; WANG, 2005).

Para avaliar melhor o desempenho da qPCR foram considerados diferentes métodos de diagnóstico como padrão-ouro: baciloscopia, cultura, cultura e/ou resposta ao tratamento específico. A baciloscopia é o principal exame laboratorial realizado de rotina em todos os pacientes com suspeita de TB pulmonar. A cultura é o exame considerado como padrão-ouro no diagnóstico bacteriológico da tuberculose, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2011). Devido à falha na sensibilidade da baciloscopia e retardo na obtenção do resultado através da cultura, um elevado número de pacientes com suspeita de TB iniciam o tratamento específico considerando a associação de critérios clínicos, epidemiológicos e resposta a terapêutica específica no diagnóstico da doença (BRASIL, 2011).

A qPCR apresentou um bom desempenho quando se considerou a baciloscopia como padrão-ouro, com uma boa concordância entre os testes. Das 66 amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar, a baciloscopia foi positiva em 62, sendo 55 positivas também na qPCR. Das 4 amostras cuja baciloscopia foi negativa, todas foram positivas na cultura e 3 na qPCR, tendo os 4 pacientes respondido ao tratamento anti-TB, podendo serem considerados como resultados falso-negativos. Em relação à cultura, encontrou-se positividade em 62, com 4 amostras negativas, porém positivas na qPCR e na baciloscopia, cujos pacientes foram tratados obtendo-se boa resposta clínica. Desta forma, estes resultados podem ser considerados como falso-negativos através da cultura. Por outro lado, em relação as 99 amostras de escarro de pacientes sem TB, 92 foram negativas e 7 positivas na baciloscopia. Destaca-se que 4, entre estas 7 amostras, tiveram menor número de bacilos (BAAR 1+), porém foram todas negativas através da cultura e qPCR. Como estes pacientes não

apresentaram crescimento para micobactérias atípicas e não responderam ao tratamento para tuberculose, provavelmente esses resultados foram falso-positivos através da baciloscopia.

A confiabilidade da leitura da baciloscopia é altamente dependente da experiência do profissional do laboratório, da qualidade da amostra e carga bacilar presente na amostra (BRASIL, 2002; CHIMARA et al., 2009; KONEMAN, et al. 2001), podendo ocasionar resultados falso-positivos ou falso-negativos. Segundo orientação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), duas amostras de escarro deveriam ser coletadas em dias consecutivos, tornando o procedimento “lento” e dificultando a adesão do paciente com o processo diagnóstico. No presente estudo optou-se por não coletar duas amostras de escarro pelas dificuldades citadas. No caso do paciente não retornar com a segunda amostra, o diagnóstico não é realizado da forma indicada e, portanto, se compromete o resultado do exame. (BRASIL, 2011).

A qPCR, considerando apenas a cultura como padrão-ouro, apresentou uma boa sensibilidade e elevada especificidade, com uma alta concordância entre os testes. Todos os pacientes que foram diagnosticados sem TB apresentaram cultura negativa, demonstrando a alta especificidade da cultura descrita na literatura (BRASIL, 2011; KIBIKI et al., 2007; LEMAÎTRE et al., 2004; YANG et al., 2010). Três pacientes que foram identificados como portadores de micobactérias atípicas (não-tuberculosas) através da cultura e teste bioquímico, foram negativos na baciloscopia e qPCR, não tendo sido iniciado o tratamento específico. Esta especificidade do sistema já foi previamente avaliada com micobactérias atípicas em estudo de otimização da técnica, sendo apenas detectado o alvo IS6110 no complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis* e *M. bovis*) (LIRA, 2009). Apesar de se poder diferenciar as micobactérias através da cultura, a demora em se obter o resultado (até 8 semanas) pode comprometer o início do tratamento (BRASIL, 2011; KIBIKI et al., 2007).

Ao considerar o padrão-ouro definido pelo nosso estudo como a cultura e/ou resposta ao tratamento específico, a qPCR apresentou um excelente desempenho, com uma boa sensibilidade e especificidade. A qPCR detectou DNA do *M. tuberculosis* em 2 amostras de pacientes cujos exames convencionais (baciloscopia e cultura) foram negativos, reatores fortes ao teste tuberculínico de Mantoux e possuíam história de contato com doença ativa. É provável que estes pacientes tivessem bacilos viáveis circulantes, tendo sido considerados como portadores de TB infecção e iniciado quimiprofilaxia secundária. Oito amostras foram negativas na qPCR, mas apresentaram cultura positiva e responderam ao tratamento, provavelmente tratando-se de amostras falso-negativas. Destas amostras, 3 apresentaram um baixo número de bacilos (BAAR 1+) e uma foi negativa na baciloscopia (CLEARY et al.,

2003; MILLER et al., 2002). Neste caso, a falta de amplificação do DNA do *M. tuberculosis* através da qPCR pode estar relacionada a ausência de ácidos nucleicos ou a presença de inibidores na amostra. No trabalho de Anjos-Filho et al. (2002) foi encontrado que cinco por cento dos espécimes clínicos avaliados continham inibidores de PCR e foram responsáveis por seis dos nove resultados falso-negativos. Outra situação que poderia justificar o resultado negativo para PCR e positivo para cultura seria a ausência ou baixo número de cópias do marcador molecular investigado em um percentual das amostras analisadas (LIMA et al., 2007). Suffys et al. (2001) ao avaliarem a PCR como ferramenta para o diagnóstico da tuberculose pulmonar utilizando o alvo IS6110, relataram positividade em apenas 44% dos casos com diagnóstico clínico e radiológico de tuberculose. A baixa sensibilidade foi justificada pela introdução de substâncias inibidoras durante o procedimento de extração.

Com o objetivo de analisar a eficiência do método de extração, algumas amostras de escarro foram submetidas à técnica de qPCR para o gene constitutivo da β -actina, que está presente em todas as células animais. Para confirmar a confiabilidade do sistema da β -actina, foram analisadas amostras verdadeiramente positivas e negativas de acordo com o padrão-ouro estabelecido, ocorrendo amplificação do gene constitutivo em todas. Para melhor avaliar as 8 amostras falso-negativas através do teste molecular, as mesmas foram submetidas a qPCR para o gene constitutivo da β -actina. Destas, em 4 não foi detectado o gene constitutivo da β -actina, ou seja, provavelmente a amostra não continha DNA. Como o DNA do *M. tuberculosis* está em concentração abaixo do DNA humano, não se pode afirmar que nas 4 amostras clínicas cujo gene da β -actina foi amplificado havia DNA do bacilo, já que o gene só está presente nas células de animais.

Ao se utilizar como padrão-ouro a cultura e/ou resposta ao tratamento, observou-se que a sensibilidade da técnica aumentou cerca de 9% (79% para 87.9%) em relação ao seu desempenho quando se considerou a baciloscopia como padrão-ouro isoladamente. O aumento observado na detecção de casos tem um impacto considerado em uma região com alta prevalência da doença, como o nordeste do Brasil. A especificidade demonstrou ser semelhante ao utilizar como padrão-ouro a baciloscopia e a cultura separadamente, porém observou-se um aumento ao definir o padrão-ouro como a cultura e/ou resposta ao tratamento. Neste caso, para se obter um melhor desempenho da qPCR, deve ser considerado além do resultado dos testes convencionais, a resposta clínica do paciente ao tratamento específico, visto que amostras paucibacilares podem não apresentar crescimento do bacilo (BRASIL, 2008, 2011)

Ao se analisar o índice *kappa* entre a qPCR e os diferentes padrões-ouro avaliados, notou-se uma boa concordância com a baciloscopia, porém seu valor aumentou progressivamente quando comparada com a cultura isolada e associada à resposta terapêutica. Deste modo, observou-se que a qPCR é um método cujo desempenho depende diretamente do nível de sensibilidade e especificidade da técnica que se considera como padrão-ouro.

Broccolo et al. (2003), utilizando o mesmo sistema do presente estudo, encontraram uma sensibilidade de 98% e especificidade de 97%, em amostras pulmonares e extrapulmonares. É provável que esse desempenho tenha sido elevado, pois o padrão-ouro definido utilizou resultados da cultura, baciloscopia, achados clínicos e radiológicos, e resposta ao tratamento antituberculose. No estudo de Armand et al. (2011) a sensibilidade da qPCR utilizando o alvo IS6110 e sonda específica *Taqman* foi de 79.1% e especificidade de 84%, enquanto que em outro trabalho se obteve também 79.1% de sensibilidade e 95.8% de especificidade para amostras respiratórias (KIM et al., 2011), desempenhos inferiores ao obtido em nosso estudo. No trabalho realizado por Lemaître et al. (2004), encontrou-se sensibilidade de 90% e especificidade de 100%, próximo ao desempenho obtido em nosso trabalho. Yang et al. (2010), avaliando a técnica de qPCR com diferentes espécimes pulmonares, obtiveram sensibilidade de 91.5% e especificidade de 98.7%. A sensibilidade foi melhor, provavelmente, por terem sido avaliadas 1.093 amostras respiratórias, além do que, foi utilizada uma extração automatizada com partículas magnéticas de sílica, considerada mais eficiente em relação aos outros métodos. Kibiki et al. (2007), em um estudo com amostras de lavado broncoalveolar (BAL) para avaliação da qPCR, obtiveram sensibilidade e especificidade de 85.7% e 90.9%, respectivamente. Kim et al. (2011) utilizando também amostras de BAL demonstraram uma sensibilidade de 91.6%, porém com perda na especificidade do sistema, sendo de 80%. Observa-se que o desempenho da qPCR com amostras de escarro nesta pesquisa foi superior a outros que utilizaram apenas amostras de BAL. Estudos que, além de escarro incluíram outros espécimes brônquicos, mostraram aumento significativo do desempenho, com sensibilidade em torno de 89%, do que aqueles que incluíram unicamente amostras de escarro, com cerca de 75% de sensibilidade. (SARMIENTO et al., 2003). Assim, o paciente com suspeita de TB tem uma maior probabilidade de ter seu diagnóstico bacteriológico através de um teste molecular quando se utiliza vários tipos de amostras.

A alta especificidade encontrada pela qPCR nesse estudo, concorda com a literatura, em que a maioria dos trabalhos apresentam especificidade acima de 95% (KIBIKI et al., 2007; KIM et al., 2011; LEMAITRE et al., 2004; YANG et al., 2010). Esta elevada

especificidade do sistema pode ser justificada pela utilização de sonda fluorogênica que hibridiza com a sequência específica do alvo. Também deve ser considerada a utilização de práticas laboratoriais adequadas, já que todo o processamento dos espécimes foi realizado em áreas de trabalho separadas, evitando a contaminação das amostras. Além disso, por ocorrer manipulação dos tubos uma única vez durante todo o processamento da qPCR, o risco de contaminação é reduzido. Por conseguinte, o resultado da qPCR pode ser utilizado como uma ferramenta excludente da tuberculose pulmonar, tornando mais rápido e eficiente o diagnóstico do paciente sem TB, e assim evitando tratamentos desnecessários e consequente emergência de cepas resistentes.

Como se tratou de um estudo de validação calculou-se o valor preditivo positivo e negativo do teste molecular. O valor preditivo positivo (VPP) indica a probabilidade do paciente com um teste positivo ter a doença. O valor preditivo negativo (VPN) demonstra qual a possibilidade de não se ter a doença caso o resultado do teste seja negativo. Ressalta-se que o VPP e VPN são variáveis dependentes da prevalência da doença na população em que teste será implementado. Assim, em localidades com menor prevalência de TB, o VPN será maior. Em países com alta incidência da doença, como no Brasil, o quadro clínico de TB pulmonar apresenta um alto VPP (KAISEMANN et al., 2004). A técnica de qPCR apresentou um elevado VPP indicando que um resultado positivo pode ser confirmatório da doença. Apesar da região estudada apresentar uma alta prevalência da doença, foi encontrado um alto VPN, indicando que o sistema de qPCR analisado quando negativo pode provavelmente ser considerado também como um fator excludente de TB pulmonar.

Para melhor avaliar o sistema de qPCR, foi calculado o valor do ciclo de amplificação limiar (C_t) para os casos positivos e para os negativos, sendo de 26,4 (19,7 – 30) e 34,0 (31,7-38), respectivamente. Nossos achados corroboram com o estudo de Kibiki e colaboradores (2007), em que a média do C_t para os casos positivos foi de 25 e para os negativos de 35. O C_t foi correlacionado com o número de bacilos quantificados na baciloscopia (em cruces). Desta forma, encontrou-se para amostras de escarro com 3+++, 2++ e 1+ uma média do C_t de 26.6, 28.3 e 31.3 ciclos, respectivamente. Desta forma, quanto maior a quantidade de bacilos presentes na amostra, mais rápida será a detecção pela qPCR, que tende a se tornar mais tardia com a diminuição do número de bacilos, concordando com a literatura (CLEARY et al., KIBIKI et al., 2007; MILLER et al., 2002).

Métodos moleculares de amplificação do DNA propostos para o diagnóstico da TB demonstram ser uma abordagem mais efetiva em relação aos métodos tradicionais, facilitando o diagnóstico do paciente e o estabelecimento do tratamento específico.

A técnica de PCR em tempo real apresenta uma série de vantagens: a possibilidade de uma análise quantitativa da amostra ser realizada em tempo real; correlacionar o resultado quantitativo da carga bacteriana, com o estágio da doença, resposta terapêutica, e resistência a drogas (PARASHAR et al., 2006); identificar e diferenciar as micobactérias não-tuberculosas (RICHARDSON; SAMSON; BANAEI, 2009); obter resultados mais rápido, pois a detecção do DNA ocorre simultaneamente à sua amplificação, sem necessidade de uma etapa pós-PCR (gel de agarose) (GARBERI et al., 2011). No entanto, há algumas desvantagens na utilização da PCR em tempo real que podem limitar seu uso em países em desenvolvimento, como: formação de uma equipe treinada, laboratório com infra-estrutura adequada, custo elevado de reagentes e equipamentos, entre outros (NDUGGA et al., 2004).

Estudos futuros serão necessários para avaliar a qPCR, principalmente nos pacientes com formas paucibacilares (como crianças e imunodeprimidos) da TB, ou seja, cujos critérios clínicos e epidemiológicos sejam compatíveis com a doença, porém com diagnóstico bacteriológico negativo através dos exames convencionais. A implementação de um sistema de PCR em tempo real seria importante para a saúde pública no Brasil, onde a TB é uma das doenças infecciosas mais prevalentes (HUGHES et al., 2012).

Através do presente estudo, ficou demonstrado que a qPCR pode ser utilizada como uma ferramenta auxiliar, tanto na confirmação quanto na exclusão da tuberculose pulmonar, porém em uma região de alta prevalência da doença, o diagnóstico deve estar fundamentado em uma análise conjunta de vários parâmetros clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e terapêuticos.

10 CONCLUSÕES

- a) A PCR em tempo real apresentou um excelente limite de detecção, sendo indicada para utilização com amostras de escarro;
- b) A PCR em tempo real apresentou um desempenho mais elevado em amostras de escarro de pacientes com TB pulmonar, quando se considerou a cultura e/ou resposta ao tratamento como padrão-ouro, em relação à baciloscopia e cultura isoladamente;
- c) Através dos valores preditivos encontrados, a PCR em tempo real provavelmente, pode ser utilizada em nosso meio como um método confirmatório e excludente da TB pulmonar;
- d) Em regiões de alta prevalência da doença, apesar do elevado desempenho demonstrado pela qPCR neste estudo, para a obtenção de um diagnóstico mais preciso, deve se considerar a associação de critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e terapêuticos;
- e) Pesquisas futuras deverão ser realizadas para avaliar o desempenho desse sistema em formas paucibacilares da TB (crianças, imunodeprimidos, portadores de HIV, entre outros).

REFERÊNCIAS

- ABADCO, D. L.; STEINER, P. Gastric lavage is better than bronchoalveolar lavage for isolation of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood pulmonary tuberculosis. Pediatric Infectious Disease Journal, Baltimore, v.11, n.9, p. 735-738, 1992.
- AFIUNE, J.B.; NETO, J.I. Diagnóstico da tuberculose pulmonar escarro negativo. Jornal de Pneumologia, Brasília, v. 19, n.1, p.37-41, 1993.
- AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in adults and children. American journal of respiratory and critical care medicine, New York, v. 161, p.1376-1395, 2000.
- ANI, A.E. Advances in the laboratory diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* . Annals of African Medicine, Sokoto, v.7, n.2, p.57-61, 2008.
- ANJOS-FILHO, L. et al. Sensitivity of amplicor MTB on direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in smear-negative specimens from outpatients in Rio de Janeiro. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 163-165, 2002.
- APPLIED BIOSYSTEMS. Real Time PCR Systems: Absolute Quantification Getting Started Guide. Atlanta, 2005. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/realtimemachine>>. Acesso em: 27 nov. 2011.
- APPLIED BIOSYSTEMS. 7500 Real-Time PCR System. Atlanta, 2011. Disponível em: <<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601251&tab=Overview>>. Acesso em: 05 dez. 2011.
- ARANGO, H.G. Bioestatística: teórica e computacional: com banco de dados reais em disco. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- ARMAND, S. et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF Test with an IS6110-TaqMan Real-Time PCR Assay for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory and Nonrespiratory Specimens. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 49, n. 5, p. 1772-1776, 2011.
- ARNOLD, C. Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical Microbiology and Infection, Oxford, v. 13, n. 2, p 120-128, 2007.
- ASSIS, N.C.S. et al. Diagnóstico da tuberculose pulmonar, Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2007.
- ASURAGEN. AB TaqMan Gene Expression Services, 2011. Disponível em: http://www.asuragen.com/Services/services/gene_expression/ab_taqman.aspx. Acesso em: 20 jan 2012.

BARRERA, L. Conventional Diagnostic Methods. In: PALOMINO, J.C; LEÃO, S.C; RITACCO, V. Tuberculosis: from basic science to patient care 2007. 1. ed, São Paulo: Atheneu, 2007.

BARRETO, A. M. W. et al. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2005.

BARRETO, L. M.; PEREIRA, M.; FERREIRA, A. Vacina BCG: eficácia e indicações da vacinação e da revacinação. Jornal de Pediatria, Rio de Janeiro, v. 82, n.3, suppl. 1, p. 324-330, 2006.

BERTOLLI, F. C. História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2001.

BETHLEM, N. Pneumologia: tuberculose. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.

BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J. Tuberculosis: commentary on a reemerging killer. Science, Washington, v. 257, n. 5073, p.1055-1064, 1992.

BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO. Informe eletrônico da tuberculose. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, ano 9, n. 2, 2009.

BRASIL. Centro de Referência Prof. Hélio Fraga. Controle da tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço, 5. ed. Rio de Janeiro: FUNASA, 2002.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras micobactérias. 3. ed. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Situação da Tuberculose no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>>. Acesso em: 12 jan 2012.

BROCCOLO, F. et al. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of Mycobacterium tuberculosis load by two real-time calibrated PCR assays. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, n. 10, p. 4565-4572, 2003.

CAFRUNE, P.I. et al. Recent transmission of tuberculosis involving retired patients. Journal of Infection, London, v. 56, n.6, p. 370-376, 2006.

CAMPOS, H. Diagnóstico da tuberculose. Pulmão RJ, Rio de Janeiro, v.15, n.2, p. 92-99, 2006.

CARVALHO, M.S.Z.M.G. Otimização da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real para a detecção específica de DNA do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. 2008. Monografia (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

CASTELO FILHO, A. et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 30, n. 1, p. 557-586, 2004.

CAVALCANTI, Z. R. et al. Características da tuberculose em idosos no Recife (PE): contribuição para o programa de controle. Jornal Brasileiro Pneumologia, Brasília, v.32, n.6, p. 535-543, 2006.

CAVALCANTI, M.P. Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por Leishmania. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, v. 58, n. 1, p. 7-10, 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5801a3.htm>> Acesso em: 5 dez 2011.

CHAGAS, M. et al. The use of polymerase chain reaction for early diagnosis of tuberculosis in *Mycobacterium tuberculosis* culture. Brazilian journal of medical and biological research, Ribeirão Preto, v. 43, n. 6, p. 543-548, 2010.

CHIMARA, E. et al. Diagnóstico bacteriológico da Tuberculose e outras micobacterioses. Pneumologia Paulista, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 630-635, 2009.

CLARK-CURTISS, J. E.; HAYDEL, S. E. Molecular Genetics of *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.57, p.517-549, 2003.

CLEARY, J.T. et al. Rapid and Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by Using the Smart Cycler Instrument and a Specific Fluorogenic Probe. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, n. 10, p. 4783-4786, 2003.

COLE, S. et al. Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature, London, v. 393, p.537-544, 1998.

CONDE, M. B. et al. III Diretrizes para Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 35, n. 10, p. 1018-1048, 2009.

CONDE, M. B.; SOUZA, M. G. R. Pneumologia e tisiologia: uma abordagem prática. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

- COUTO-SANT'ANNA, C. et al. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by score system in children and adolescents: a trial in Reference center in Bahia, Brazil. Journal of Infectious Disease, Oxford, v. 8, n. 4, p. 305-310, 2004.
- CRUZ, H. L. A. et al. Evaluation of a nested-pcr for *Mycobacterium tuberculosis* detection in blood and urine samples. Brazilian Journal of Microbiology, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 321-329, 2011.
- DROBNIIEWSKI, F. A. et al. Modern laboratory diagnosis os Tuberculosis. Lancet Infectious Diseases, New York, v. 3, n. 3, p. 141-147, 2003.
- DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.
- EISENSTEIN, B. I. The Polimerase Chain Reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. The New England Journal of Medicine, Massachusetts, v. 322, n. 3, p 178-183, 1990.
- FERREIRA, W. A.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e parasitárias e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- GARBERI, J. et al. Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* using molecular biology technology. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Beijing, v. 11, p. 89-93, 2011.
- GOMES, A. L. V. Desenvolvimento e validação da detecção molecular da infecção por *Schistosoma mansoni* em lotes de moluscos vetores para identificação de focos de transmissão. 2008. Tese (Mestrado em Ciências) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.
- GUERRA R.L. et al. Use of the Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test in a public health laboratory: test performance and impact on clinical care. Chest Journal, Park Ridge, v. 132, n. 3, p. 946- 951, 2007.
- GUERRA, R. L. et al. Diagnóstico da tuberculose pulmonar em pacientes com baciloscopia direta de escarro negativa. Pulmao RJ, Rio de Janeiro, v. 17, n.2, p.87-90, 2008.
- HANNA, H. A. Diagnosis of tuberculosis by microbiologic techniques. In: ROM, WN. & GARAY, S. Tuberculosis, Edinburgh: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.
- HELB, D. et al. Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.48, n.1, p. 229-237, 2010.
- HELLYER, L. J. et al. Specificity of IS6110-based amplification assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. Journal of clinical microbiology, Washington, v. 34, n. 11, p. 2843-2846, 1996.
- HINRICHSEN, S. L. DIP: Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

HOPEWELL, P. C. Tuberculosis and other mycobacterial diseases. In: MASON, R. J. et al. Murray and Nadel's textbook of respiratory medicine. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2005, p.1094–1244.

HUGHES, R. et al. The cost effectiveness of Nucleic Acid Amplification Techniques for the diagnosis of tuberculosis. Respiratory Medicine, London, n. 106, v. 2, p. 300-307, 2012.

ISSA, R. et al. Detection and discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v. 72, n. 1, p. 62-67, 2012.

KALTENBOECK, B.; WANG, C. Advances in real-time pcr: application to clinical

laboratory diagnostics. Advances in Clinical Chemistry, Alabama, v. 40, n. 1, p. 219-259, 2005.

KENT, T. P.; KUBICA, G. Public health mycobacteriology: a guide for level III laboratory. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1985.

KHÉCHINE, A.; DRANCOURT, M. Diagnosis of pulmonary tuberculosis in a microbiological laboratory. Médecine et Maladies Infectieuses, Paris, v. 41, n.10, p. 509-517, 2011.

KIBIKI, S. G. et al. Laboratory of pulmonary tuberculosis in TB and HIV endemic settings and the contribution of real time PCR for *M. tuberculosis* in bronchoalveolar lavage fluid, Tropical Medicine and International Health, Oxford, v.12, n.10, p.1210-1217, 2007.

KIM, M. H. et al. Comparison of in-house PCR with conventional techniques and cobas amplicor *M. tuberculosis* kit for detection of *Mycobacterium tuberculosis*, Yonsei Medical Journal, Seoul, v. 49, n. 4, p.537–544, 2008.

KIM, J. H. et al. Evaluation of Cobas TaqMan MTB PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 49, n. 1, p. 173-176, 2011.

KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KUBISTA, M. et al. The Real Time Polymerase Chain Reaction. Molecular Aspects of Medicine, Elmsford, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.

LANGE, C.; MORI, T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. Respirology, Carlton, v.15, n. 2, p. 220-240, 2010.

SILVA, J. R. L.; BOÉCHAT, N. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v.30, n.4, p.388-394, 2004.

LEMAÎTRE, N. et al. Comparison of the Real-Time PCR Method and the Gen Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for Detection of *Mycobacterium*

tuberculosis in Pulmonary and Nonpulmonary Specimens. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 42, n. 9, p. 4307-4309, 2004.

LEROY, V.; SALMI, L. R.; DUPON, M. Progression of human immunodeficiency virus infection in patients with tuberculosis disease. A cohort study in Bordeaux, France 1988-1994. American Journal of Epidemiology, Baltimore, v.145, p.193-200, 1997.

LIMA, K.V. et al. Nested-PCR for gene that encodes the antigen b applied to the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 40, n. 2, p. 212-215, 2007.

LIMA, J. F. C et al. Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. Jornal brasileiro de pneumologia, Brasília, v. 35, n. 7, p. 690-697, 2009.

LIRA, L. A. S. Análise do desempenho da técnica de PCR em tempo real através de sonda específica no diagnóstico da tuberculose. 2009. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2009.

LOGAN, J.; EDWARDS, K.; SAUNDERS, N. Real-time PCR: current technology and applications. 1. ed. London: Caister Academic, 2009.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, Oxford, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.

MATHEMA, B. et al. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights, Clinical Microbiology Reviews, Washington, v.19, n.4, p. 658-685, 2006.

MELLO, L. C. Q. Modelos preditivos para o diagnóstico da tuberculose pulmonar paucibacilar. 2001. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MILLER, N. Rapid and Specific Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Acid-Fast Bacillus Smear-Positive Respiratory Specimens and BacT/ALERT MP Culture Bottles by Using Fluorogenic Probes and Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 40, n. 11, p. 4143-4147, 2002.

MOORE, D. F.; GUZMAN, J. A.; MIKHAIL, L. T. Reduction in turnaround time for laboratory diagnosis of pulmonary tuberculosis by routine use of a nucleic acid amplification test. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v. 52, n. 3, p. 247-254, 2005.

NABIN, K. S. et al. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous Mycobacterial isolates by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, n. 11, p.5121-5126, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (Estados Unidos). Quantitative molecular methods for infectious diseases: proposed guidelines. Estados Unidos, 2001.

NDUGGA, L. K. et al. Comparison of PCR with the Routine Procedure for Diagnosis of Tuberculosis in a Population with High Prevalences of Tuberculosis and Human Immunodeficiency Virus. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 42, n. 3, p. 1012-1015, 2004.

NEGI, S. S. et al. Comparison of the conventional diagnostic modalities, bactec culture and polymerase chain reaction test for diagnosis of tuberculosis. Indian Journal of Medical Microbiology, Mumbai, v.23, n.1, p.29-33, 2005.

NICOL, M. P.; ZAR, H. J. New specimens and laboratory diagnostics for childhood pulmonary TB: progress and prospects. Paediatric Respiratory Reviews, London, v. 12, n. 1, p. 16-21, 2011.

NOVAIS, C. M. et al. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 33, p. 10-13, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Tuberculosis Facts 2006.

Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/2006/tb_factsheet_2006_1_en.pdf>.

Acesso em: 15 jan 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing. Disponível em:

<http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf> Acesso em: 05 jan 2011.

PANDOLFI, J. R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara, v. 28, n.3, p. 251-257, 2007.

PARASHAR, D. et al. Applications of real time PCR technology to mycobacterial research, Indian Journal of Medical Research, Mumbai, v. 124, n. 1, p. 385-398, 2006.

PICON P. D. et al. Tuberculose: Epidemiologia, Diagnóstico e tratamento em clínica e saúde pública. 1. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1993.

PORTILLO-GÓMEZ, L.; MORRIS, S. L.; PANDURO, A. Rapid and efficient detection of extrapulmonary *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, Paris, v. 4, n. 4, p.361-370, 2000.

REBOLLO, M. J. et al. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, New York, v. 56, n. 2, p. 141-146, 2006.

RICHARDSON, E. T; SAMSON, D; BANAEI, N. Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 47, n. 5, p. 1497-1502, 2009.

RODRIGUES, L. et al. Resposta brasileira à tuberculose: contexto, desafios e perspectivas, Revista de Saúde Pública, São Paulo, v.41, n.1, p.1-2, 2007.

- ROSSO, F. Contribuição da detecção de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em diferentes amostras para o diagnóstico da tuberculose pulmonar. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v.35, n.1 p. 51-58, 2002.
- SANKAR, S. et al. An Appraisal of PCR-Based Technology in the Detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Diagnosis & Therapy, Naperville, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2011.
- SARMIENTO, O.L. et al.. Assessment by Meta-Analysis of PCR for Diagnosis of Smear-negative Pulmonary Tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 41, n. 7, p. 3233-3240, 2003.
- SAVELKOUL, P. H. M. et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with real time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element, Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v.66, n.1, p.177-180, 2006.
- SCHERER L.C. et al. Comparison of two laboratory-developed PCR methods for the diagnosis of Pulmonary Tuberculosis in Brazilian patients with and without HIV infection. BMC Pulmonary Medicine, London, v. 11, n. 15, p. 1471- 1476, 2011.
- SEVERO, N.; LEITE, C. Caracterização da população portadora de tuberculose do município de Américo Brasiliense/SP, no período de 1992 a 2002. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, Araraquara, v. 26, n. 1, p. 83-86, 2005.
- SHRESTHA, N. K. et al. Detection and differentiation of *M. tuberculosis* and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.41, n. 11, p. 5121–5126, 2003.
- SILVA, C. L. Tuberculose. Dr! A Revista do Médico, São Paulo, v. 16, p. 22-23, 2002.
- SILVIA, C. L. Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose. Relatório das atividades de pesquisa 2002-2004. 1. ed. São Paulo: Instituto do Milênio Rede TB, 2005.
- SNIDER D. E. et al. Tuberculosis in children. Pediatric Infectious Disease Journal, Baltimore, v. 7, n. 4, p. 271-278, 1988.
- SOINI, H.; MUSSER, J. M. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clinical Chemistry, New York, v.47, n. 5, p.809-814, 2001.
- STOP TB. New Laboratory Diagnostic Tools for TB Control. Geneva, 2008. Disponível em: <http://www.stoptb.org/assets/documents/global/retooling/Diagnostic_Brochure_Print_2009_Jan_29.pdf>. Acesso em: 15 jan 2012.
- STOP TB. Priorities in Operational Research to improve Tuberculosis Care and Control, Geneva, 2011. Disponível em:

<<http://www.stoptb.org/assets/documents/resources/publications/technical/StopTB%20Guide.pdf>.
> Acesso em: 10 jan. 2012.

SUFFYS, P. et al. Inhibition of the polymerase chain reaction by sputum samples from tuberculosis patients after processing using a silica- guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 96, n. 8, p. 1137-1139, 2001.

THIERRY, D. et al. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Insertion Sequence, IS6110, and Its Application in Diagnosis. Nucleic Acid Research, Oxford, v.28, n. 12, p. 2668-2673, 1990.

THORNTON, C. G. et al. Processing respiratory specimens with C18 carboxypropylbetaine: development of a sediment resuspension buffer that contains lytic enzymes to reduce the contamination rate and lecithin to alleviate toxicity. Journal of clinical microbiology, Washington, v. 36, n. 7, p. 2004-2013, 1998.

YAJKO, D. M. et al. Quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical sputum specimens and dilution endpoint of its detection by the Amplicor PCR assay. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 33, n. 7, p. 1944-1947, 1995.

YANG, Y. et al. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB Test for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens. Journal of Clinical Microbiology, Washington v. 49, n. 3, p. 797-801, 2011.

ZAMARIOLI, L. A. et al. Identificação laboratorial de micobactérias em amostras respiratórias de pacientes HIV-positivos com suspeita de tuberculose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 42, n.3, p. 290-297, 2009.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

PACIENTE: _____	IDADE: _____
HOSPITAL: _____	Prontuário: _____
ENDEREÇO DO PACIENTE: _____	Nº: _____
BAIRRO: _____	CIDADE: _____ ESTADO: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO

O Sr(a) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa: "Análise do desempenho da técnica de PCR em tempo real na detecção específica e quantificação absoluta do *Mycobacterium tuberculosis* para o diagnóstico da tuberculose pulmonar". Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: Análise do desempenho da técnica de PCR em tempo real na detecção específica e quantificação absoluta do *Mycobacterium tuberculosis* para o diagnóstico da tuberculose pulmonar

Pesquisador (a) Responsável: Lais Ariane de Siqueira Lira

Telefones para contato: (81) 2101-2569

Pesquisadores Participantes: Lilian Maria Lapa Montenegro, Haiana Charifker Schindler.

Objetivos: O objetivo da nossa pesquisa é testar um novo exame diagnóstico que apresente o resultado da doença mais rápido do que os exames que são usados de rotina nos Hospitais de referência para tuberculose.

Procedimentos do estudo: Quando o Sr(a) for atendido pelo médico(a) assistente do hospital, você responderá a um questionário onde irão constar: nome, endereço, telefone para contato, característica do domicílio, escolaridade, queixas principais e tempo de duração, se está tomando algum remédio, exames físico, laboratoriais e tratamento atual. O preenchimento do questionário será feito por um dos colaboradores da pesquisa.

Caso for detectada a doença será utilizado como terapia de primeira escolha o esquema com rifampicina, isoniazida e pirazinamida para o tratamento e se necessário, um esquema de segunda escolha será oferecido em casos selecionados. O Tratamento será fornecido pelo Posto de Saúde do Programa de Saúde da Família. O Sr(a) será acompanhado durante os seis meses de tratamento por uma equipe formada de enfermeiros, médicos e pesquisadores com experiência em tuberculose. Esses profissionais farão outros exames necessários de rotina do hospital. O acompanhamento e tratamento serão feitos pelo médico assistente do serviço que, cujos pacientes estão sendo investigados quanto à existência ou não de Tuberculose.

Para a nossa pesquisa coletaremos a quantidade de catarro (\pm 5ml, meia colher de sopa) que o Sr.(a) conseguir colocar pra fora (quando tossir). Esse catarro será encaminhado ao Laboratório de Imunoepidemiologia do Departamento de Imunologia do CPqAM para ser realizado o exame de cultura, de baciloscopia e de biologia molecular que é para observar o DNA da bactéria que causa a doença: tuberculose. Os resultados de todos os exames serão encaminhados ao médico responsável pelo atendimento. A baciloscopia será realizada no laboratório dos Hospitais que realizarem o exame ou encaminhamento para o LACEN.

Riscos e Benefícios: O Sr (a) não será submetido a qualquer risco ou desconforto adicional e seguiremos a rotina estabelecida pelo profissional de saúde, seja a nível ambulatorial ou enfermaria. O benefício deste estudo será ajudar no desenvolvimento de técnicas de laboratório mais sensíveis, e rápidas que possam ser implantadas à realidade do nosso Sistema de Saúde, para beneficiar um melhor tratamento e a cura mais rápida da tuberculose pulmonar.



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

Custo/Reembolso para o paciente: Não haverá nenhum gasto com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

Banco de Amostras: Um parte da amostra de catarro será congelada, armazenada e guardada no Laboratório de Imunoepidemiologia do CPqAM para que possamos repetir o exame da nossa pesquisa, caso seja necessário, assim entraremos em contato com o Sr.(a) para informar tal procedimento. O Sr (a) poderá entrar em contato com o responsável pela amostra no endereço abaixo:

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Laboratório de Imunoepidemiologia, Departamento de Imunologia
Avenida Moraes Rego, s/n°, Cidade Universitária.
Campus da UFPE.
Fone: (81) 2101-2569
Contato: Laís Ariane de Siqueira Lira, Lillian Maria Lapa Montenegro, Haiana Charifker Schindler.

CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG/CPF _____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionado ou constrangido concordo participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o nome do paciente.

Endereço do Paciente: _____

Telefone: _____

Assinatura do paciente ou do responsável

Assinatura do médico/pesquisador

APÊNDICE B- Ficha clínica-epidemiológica

PROTOCOLO DE PESQUISA DE TUBERCULOSE

IDENTIFICAÇÃO		
1. Número da ficha na pesquisa <div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 15px; margin: 5px 0;"></div>	2. Data da entrevista ____ / ____ / ____	
3. Procedência: 1. Ambulatório <input type="checkbox"/> 2. Enfermaria <input type="checkbox"/>	4. Número do Prontuário do Hospital <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 15px; margin: 5px 0;"></div>	
5. Hospital de origem: 1. Hospital das Clínicas <input type="checkbox"/> 2. Hospital Otávio de Freitas 3. IMIP 4. Hospital Barão de Lucena 5. Outro: _____	6. Número do SAME <div style="border: 1px solid black; width: 150px; height: 15px; margin: 5px 0;"></div>	
DADOS DO PACIENTE		
7. Nome Completo do Paciente _____ _____		
8. Nome da Mãe ou Responsável _____ _____		
9. Data de nascimento ____ / ____ / ____	10. Idade do paciente <div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></div> anos <div style="border: 1px solid black; width: 20px; height: 15px;"></div> meses </div>	11. Sexo 1. Feminino <input type="checkbox"/> 2. Masculino
12. Endereço _____ _____ Ponto de referência _____ _____		
13. Bairro _____	14. Cidade _____	15. UF <div style="border: 1px solid black; width: 30px; height: 15px; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> </div>
16. Telefone Res. e Celular (____) _____ - _____ (____) _____ - _____	17. CEP _____	18. Zona de localização da moradia 1. Urbana <input type="checkbox"/> 2. Rural
DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS		
19. Grau de instrução do paciente 1. Analfabeto 2. Iniciou alfabetização <input type="checkbox"/> 3. 1º grau 4. 2º grau 5. 3º grau 6. Outro	20. Renda familiar mensal 1. Menor ou igual a 1 salário mínimo 2. De 2 a 4 salários mínimos 3. Mais que 5 salários mínimos 4. Biscate 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/>	

21. Quantas pessoas moram na casa do paciente? 1. Até 3 <input type="checkbox"/> 2. De 4 a 6 3. Mais de 6 8. Não sabe informar	22. Quantos adultos? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 3. Mais que 5	23. Quantas crianças? 1. Até 2 <input type="checkbox"/> 2. De 3 a 5 3. Mais que 5	24. Quantos cômodos (locais de dormir) têm na casa? 1. Um <input type="checkbox"/> 2. De 2 a 4 3. Mais de 4 8. Não sabe informar
25. O senhor(a) ou algum adulto na casa fuma? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	26. O senhor(a) ou alguém na casa bebe? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	27. Existe algum caso de HIV na família? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	
28. Existe algum caso de alcoolismo na família? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	29. Uso de drogas na família 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar	30. Existe alguém da família ou do convívio que faz tratamento prolongado para TB? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 3. Sim -não sabe informar a doença 8. Não sabe informar	
31. Raça/Cor 1. Branca <input type="checkbox"/> 2. Preta 3. Parda 4. Amarela 5. Indígena			
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS			
30. Existe algum caso de tuberculose na família ou em pessoa de convívio? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar		32. O caso foi confirmado? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar 9. Inaplicável Caso a resposta seja Não, pular para 34	
31. Caso sim, há quanto tempo? _____ Caso a resposta seja Não, seguir para 39			
33. O caso foi confirmado por baciloscopia e/ou cultura? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não 8. Não sabe informar 9. Inaplicável		34. Qual o grau de parentesco? 1. Mãe <input type="checkbox"/> 2. Pai 3. Irmã (o) 4. Avô (ó) 5. Tio (a) 6. Primo (a) 7. Outro 8. Não sabe informar 9. Inaplicável Outro:	
35. Período de duração do contato: 1. < 3 meses <input type="checkbox"/> 2. 3 meses a 2 anos 3. + que 2 anos 8. Não sabe informar 9. Inaplicável		36. Qual o tipo de contato? 1. Intradomiciliar contínuo (5 a 7 dias/semana, > 6h/dia) 2. Intradomiciliar intermitente (5 a 7 dias/semana, < 6h/dia) 3. Esporádico (entre 2 a 4 dias/semana) 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável	
37. Em relação ao tratamento para TB o contato: 1. Foi tratado totalmente 2. Está em tratamento 3. Não tratado 4. Interrompeu o tratamento <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável		38. Qual o motivo da interrupção: 1. Intolerância ao medicamento 2. Falta de medicamento 3. Abandono do tratamento 4. Outro motivo <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	

Caso não tenha havido interrupção, seguir para 39.		
ANTECEDENTES DO PACIENTE		
39. Já teve alguma doença? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Caso a resposta seja Não, seguir para 41	40. Qual doença? 1. Asma <input type="checkbox"/> 6. Fibrose Cística <input type="checkbox"/> 2. Pneumonia <input type="checkbox"/> 7. HIV/AIDS <input type="checkbox"/> 3. Bronquite <input type="checkbox"/> 8. Câncer <input type="checkbox"/> 4. Tuberculose <input type="checkbox"/> 9. Não sabe <input type="checkbox"/> 5. Diabetes <input type="checkbox"/> 10. Outro: _____	
41. Tem cicatriz de BCG? (vista pelo entrevistador no braço direito ou através de cartão) 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não verificado <input type="checkbox"/>		
43. Fez PPD anterior? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Data de realização: ____/____/____ (Vê no cartão) Caso não tenha feito, seguir para 45.	44. Resultado do PPD: 1. Não reator (0-4mm) <input type="checkbox"/> 4. Reator muito forte (>15mm) <input type="checkbox"/> 2. Reator fraco (5-9mm) <input type="checkbox"/> 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 3. Reator forte (10-14mm) <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	
45. Toma algum medicamento atualmente? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Qual: _____	46. Já fez TTO para tuberculose? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Qual: _____ Caso sim, quanto tempo? _____ Caso sim, número de TTO anteriores: _____	
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (referidos pelo Informante)		
47. Há quanto tempo o paciente está doente? <input type="text"/> <input type="text"/> meses <input type="text"/> <input type="text"/> dias	48. Tem febre? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Caso sim, há quanto tempo: _____	49. Perda de peso? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
50. Tem tosse? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Caso sim, há quanto tempo: _____	51. Tipo de tosse: 1. Seca <input type="checkbox"/> 2. Produtiva <input type="checkbox"/> 3. Hemoptise <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	52. Tem falta de apetite? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
56. Tem fraqueza muscular? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	57. Apresenta falta de ar desde que ficou doente? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	58. Tem dor nas juntas? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/> Caso não, seguir para 60.
59. Qual o local? 1. Joelho <input type="checkbox"/> 2. Cotovelo <input type="checkbox"/> 3. Punho <input type="checkbox"/> 4. Coluna <input type="checkbox"/>	60. Apresenta dor na barriga? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>	61. Notou aumento da barriga? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>
62. Notou linfonodo (lândria ou íngua) aumentado? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	63. Local do linfonodo: 1. Pescoço <input type="checkbox"/> 2. Axila <input type="checkbox"/> 3. Região inguinal (virilha) <input type="checkbox"/>	64. Apresenta suor noturno? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> 8. Não sabe <input type="checkbox"/>

8. Não sabe	Outros _____			
INVESTIGAÇÃO CLÍNICA (preenchida pelo médico acompanhante)				
Médico Responsável:			Fone:	
65. Peso _____ Kg			66. Estatura _____ m	
1. Sim 2. Não 8. Não investigado				
68. Palidez <input type="checkbox"/>	69. Adinamia <input type="checkbox"/>	70. Toxemia <input type="checkbox"/>	71. Desnutrição <input type="checkbox"/>	
72. Linfadenomegalia Cervical: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado		73. Linfadenomegalia Axilar: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado		
74. Linfadenomegalia Inguinal: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado	75. Linfadenomegalia em outro local: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado	76. Apresenta micropoliadenomegalia generalizada? 1. Sim 2. Não 8. Não investigado		
77. Presença de sinais inflamatórios: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado 9. Inaplicável				
1. Sim 2. Não 8. Não investigado				
81. Taquipnéia <input type="checkbox"/>	82. Eupnéico <input type="checkbox"/>	83. Dispnéia <input type="checkbox"/>	84. Cianose <input type="checkbox"/>	85. BAN <input type="checkbox"/>

Ausculta (83 ao 89) 1. Sim 2. Não 8. Não investigado					
83. MV Normal <input type="checkbox"/>	84. MV diminuído <input type="checkbox"/>	85. MV ausente <input type="checkbox"/>	86. Roncos <input type="checkbox"/>	87. Crepitação <input type="checkbox"/>	88. Sibilância <input type="checkbox"/>
89. Broncofonia <input type="checkbox"/>	90. Aparelho cardíaco: 1. Normal 2. Alterado Caso seja Normal, seguir para 94		Tipo de alteração: Sopro: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado	92. Arritmia: 1. Sim 2. Não 8. Não investigado	93. Outros: 1. Sim 2. Não 8. Não Investigado

94. Abdome: 1. Normal 2. Hepatomegalia 3. Ascite 4. Esplenomegalia <input type="checkbox"/> 5. Hepatoesplenomegalia 6. Outros _____		95. Sistema Nervoso: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado <input type="checkbox"/>	
96. Se alterado, especifique: _____ _____		97. Sist. Músculo-esquelético: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado Caso seja Normal, seguir para 104	
98. Localização da(s) articulação(ões) acometida(s): _____ _____			
Tipo de alteração: 99. Edema: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	100. Calor: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	101. Dor: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>	102. Rubor: 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>
103. Deformidades:			
1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/>			
EXAMES LABORATORIAIS (preenchido pelo médico pesquisador)			
104. Realizou hemograma? 1. Sim 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> 2. Não 9. Inaplicável Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 110		105. Resultado da Hemoglobina _____ (g/dL)	
107. Caso sim: 1. Características de Infecção viral 2. Características de infecção bacteriana 3. Não sabe		106. Alteração do leucograma 1. Sim 2. Não 3. Não sabe	
109. Valor do VSH _____ mm			
110. Realizou Raio X de Tórax na admissão? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 112		111. Resultado do Raio X de admissão: 1. Normal 2. Alterado <input type="checkbox"/> - Se alterado: <input type="checkbox"/> 1. Padrão não sugestivo de TB 2. Forma Pneumônica 3. Forma Pneumoganglionar 4. Forma Pleuropulmonar 5. Forma Miliar 6. Forma Ganglionar 7. Inaplicável 8. Não sabe informar	
112. Realizou Raio X de tórax de controle? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 114		113. Resultado do Raio X de controle: 1. Normalizou <input type="checkbox"/> 2. Houve melhora 3. Houve piora 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	
114. Realizou Tomografia de tórax? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 116		115. Resultado da Tomografia de tórax: 1. Normal <input type="checkbox"/> 2. Alterado sugestivo 3. Alterado inespecífico 8. Não sabe informar 9. Inaplicável	

116. Realizou PPD para pesquisa? 1. Sim 2. Não 8. Não sabe informar <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 118		117. Resultado do PPD: 1. Não reator (0-4mm) 2. Reator fraco (5-9mm) 3. Reator forte (10-14mm) 4. Reator muito forte (>15mm) 8. Não sabe informar 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	
121. Realizou Baciloscopia? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 124		122. Resultado da baciloscopia: 1. Positiva 2. Negativa 9. Inaplicável <input type="checkbox"/> _____ Cruzes	
124. Realizou Cultura em meio Lowestein-Jensen? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____ Caso a resposta seja Não, seguir para 130.		125. Resultado da Cultura: 1. Positiva 2. Negativa 9. Inaplicável <input type="checkbox"/>	
136. Diagnóstico inicial 1. TB infecção 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita 4. Não é TB		137. Data da notificação: Data: ____/____/____ Profissional que notificou: _____	
138. Diagnóstico Final 1. TB infecção 2. TB doença <input type="checkbox"/> 3. TB suspeita 4. Não é TB		139. Forma de TB 1. Pulmonar 2. Extra pulmonar <input type="checkbox"/>	
140. Tratamento realizado: 1. Profilaxia primária (INH por 3 meses) <input type="checkbox"/> 2. Profilaxia secundária (INH por 6 meses) 3. Esquema I (INH + RMP por 6 meses e PZA por 2 meses) - Tradicional 4. Esquema IR (INH + RMP + BEM por 6 meses e PZA por 2 meses) 5. Esquema II (INH + RMP por 9 meses e PZA por 2 meses) 6. Esquema III (SM + PZA por 3 meses e ETH + EM por 12 meses) 9. Inaplicável		141. Data do início do tratamento: ____/____/____	
142. Tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico de TB: 1. ≤ 1 mês 2. 1 – 3 meses 3. ≥ 3 meses <input type="checkbox"/> 4. Não investigado		143. Tempo entre o diagnóstico de TB e início do tratamento específico: 1. ≤ 1 mês 2. 1 – 3 meses 3. ≥ 3 meses <input type="checkbox"/> 4. Não investigado	
EVOLUÇÃO			

144- Resposta ao tratamento específico (feita pelo médico acompanhante)	
1. Melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Resposta ao tratamento) <input type="checkbox"/> 2. Não houve melhora clínica evidente após 30 dias de início do tratamento (Não houve resposta ao tratamento) <input type="checkbox"/> 9. Inaplicável	
Entrevistador: _____	Assinatura: _____

DIAGNÓSTICO MOLECULAR		
145. Realizou Nested-PCR pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____	146. Resultado 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	147. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99. <input type="checkbox"/> Não se aplica
148. Realizou Nested-PCR Único Tubo pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____	149. Resultado 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	150. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99. <input type="checkbox"/> Não se aplica
151. Realizou PCR colorimétrica pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____	152. Resultado 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	153. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99. <input type="checkbox"/> Não se aplica
154. Realizou RT-PCR pré-tratamento? 1. Sim <input type="checkbox"/> 2. Não <input type="checkbox"/> Data: ____/____/____	155. Resultado 1. Positivo <input type="checkbox"/> 2. Negativo <input type="checkbox"/> 9. Não se aplica <input type="checkbox"/>	156. Amostra biológica: 1. <input type="checkbox"/> Sangue total 6. <input type="checkbox"/> Líq. Pleural 2. <input type="checkbox"/> Soro 7. <input type="checkbox"/> Biópsia de gânglio 3. <input type="checkbox"/> Células brancas 8. <input type="checkbox"/> Urina 4. <input type="checkbox"/> Escarro 9. <input type="checkbox"/> Outros 5. <input type="checkbox"/> Lav. Gástrico 99. <input type="checkbox"/> Não se aplica

Responsável pelo preenchimento da ficha: _____

Responsável pelos exames moleculares: _____

ANEXO A- Parecer de Aprovação do CEP-CPqAM



Título do Projeto: “Análise do desempenho da técnica de PCR em tempo real na detecção específica e quantificação absoluta do Mycobacterium tuberculosis para o diagnóstico da tuberculose pulmonar.”.

Pesquisador responsável: Laís Ariane de Siqueira Lira

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 16/11/2010

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 86/10

Registro no CAAE: 0086.0.095.000-10

PARECER Nº 78/2010

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 13 de dezembro de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de dezembro de 2010.


Giselle Camposana Gouveia
Farmacêutica
Coordenadora
Mat. SIAPE 0455378
CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 13/12/2011.

Campus da UFPE - Av. Moraes Rebelo
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

